

Renata Pietsch Ribeiro

**EFEITOS DO PROBUCOL E SUCCINOBUOL NA
NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA
6-HIDROXIDOPAMINA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Farina

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Cláudia P. Figueiredo

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ribeiro, Renata Pietsch

Efeitos do probucol e succinobucol na neurotoxicidade
induzida pela 6-hidroxidopamina / Renata Pietsch Ribeiro ;
orientador, Marcelo Farina ; co-orientadora, Cláudia
Figueiredo. - Florianópolis, SC, 2013.
66 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Doença de Parkinson. 3. 6-
hidroxidopamina. 4. camundongo. 5. SH-SY5Y. I. Farina,
Marcelo. II. Figueiredo, Cláudia. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Neurociências. IV. Título.

“Queremos ter certezas e não dúvidas,
resultados e não experiências,
mas nem mesmo percebemos que as
certezas só podem surgir através das dúvidas
e os resultados somente através das experiências”.

Carl Gustav Jung

Dedico este trabalho à minha família:

Teco, meu marido, minha inspiração e meu principal incentivador.

*Clara e João Vicente, nossos lindos filhos, razão do meu esforço,
que nasceram no meio do doutorado.*

*Nelson e Teresa, meus pais, exemplos de amor e dedicação, que me
apoiaram incondicionalmente.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Marcelo Farina, que me aceitou sem me conhecer, mesmo sem ter nenhuma referência. Agradeço pela oportunidade e por todo conhecimento dividido comigo, também pelo apoio, incentivo e compreensão nos momentos mais complicados.

Ao Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC) que permitiu meu afastamento para me dedicar aos estudos, e aos meus colegas de trabalho que muitas vezes me pouparam por compreenderem a dificuldade que é em estudar e trabalhar ao mesmo tempo. Agradeço especialmente à minha coordenadora e amiga Berenice por toda ajuda nos vai-e-vens dos editais de afastamento!

Sou muito grata aos meus amigos do laboratório que tanto me ajudaram, além de tornarem os dias de experimentos e estudos muito felizes! Obrigada Danúbia e Dirleise (Dan & Di – grandes amigas! Me ajudaram muito, muito! Obrigada mesmo! Serei eternamente grata por tudo!), Alessandra (querida Ale que tanto insistiu para que eu repensasse uns experimentos e me deu uma baita ajuda com o formato A5!), Mariana (Mari querida amiga que me estimulou, me corrigiu e me ajudou muito! Corrigiu a minha quali e me ajudou nos experimentos seguintes), Eduardo (que me ajudou muito no artigo já publicado, nos experimentos e também no planejamento), Aline (minha querida Limãozinho que participou ativamente do segundo artigo), Juliana (Naniquete, sempre alegre querendo fazer 1000 coisas ao mesmo tempo!), Viviane (Vivi, que estava sempre no laboratório querendo aprender, perguntando se podia ajudar em “mais alguma coisa”) e Kaite (que fez muita coisa no primeiro artigo e nos faz falta até hoje)! Vocês todos foram (e são) muito importante para mim!

Ao Giani, amigo do “lab ao lado”, que sempre me ajudou com os computadores!

Ao Dr. Marcelo de Godoi, aluno de pós-doutorado do professor Dr. Antônio Braga, pela síntese do succinobucol (e também por fazer minha amiga feliz!).

Ao professor Dr. Alcir Luiz Dafre pelo empréstimo da câmara do *single-pellet* e ao professor Dr. Rui Prediger pelo equipamento do *rotarod*.

Aos professores da UFSC, do programa de pós-graduação em Neurociências e Bioquímica que me permitiram tanto aprendizado! Muito obrigada!

Aos amigos do LAMEB – Bibi, Vanessa e Denis – por todo auxílio nos experimentos, pela disponibilidade e pela alegria nos momentos partilhados.

Ao Nivaldo, secretário do programa de pós-graduação em Neurociências, pela atenção, disponibilidade e ajuda nos trâmites administrativos.

Por fim, porém não menos importante, agradeço à minha família – meu marido Teco, por me apoiar, me incentivar, estimular e entender toda minha ausência nesses anos de doutorado. E por muitas vezes realmente me conduzir, quando estava difícil continuar...

Aos meus filhos, Clara e João Vicente, pela alegria de ter vocês por perto, pela felicidade de ser mãe de crianças tão encantadoras e por me manterem sempre ciente do que é importante na vida. Obrigada por me fazerem sentir a pessoa mais amada do mundo!

Aos meus pais Nelson e Teresa que sempre me incentivaram e apoiaram, desde o início da minha carreira acadêmica. Eles compreenderam a dificuldade e até mudaram de cidade para estar por perto quando os meus filhos necessitavam e a mãe não podia estar... Abasteceram a casa, pagaram contas atrasadas, levaram as crianças de um lado para o outro!

A minha sogra, Elsa, que muitas vezes também veio nos dar apoio com as crianças, e por toda sua compreensão e sabedoria que só ajudaram nos momentos mais difíceis.

Ao meu irmão por sempre torcer por mim e demonstrar seu carinho e apreço mesmo de longe... E a minha sobrinha Bruna, que recebi de coração aberto este ano e que está me fazendo aprender muito sobre a adolescência!

Aos demais amigos queridos (incluindo minhas três lindas cunhadas, minhas “primas” Paula e Helena – “a outra”, segundo CRG – queridíssimas que vieram me ver e só me viram trabalhando!), amigos do Rio e de Floripa pela confiança, amizade, carinho, amor, por estarem sempre comigo, de perto ou de longe.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda dos neurônios dopaminérgicos da via nigrostriatal. Embora a etiologia da doença em humanos seja desconhecida, há evidências experimentais de que o estresse oxidativo possa ser um evento precoce e causal. O probucol e seu derivado succinobucol são compostos fenólicos hipolipidêmicos com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes que recentemente têm sido relatados como protetores em modelos de neurotoxicidade e neurodegeneração. Esta tese teve o objetivo de investigar os efeitos dessas substâncias sobre a vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos nigro-estriatais frente ao estresse oxidativo em modelos *in vivo* e *in vitro* utilizando a neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA), a qual é utilizada em modelos experimentais da DP. Camundongos *Swiss* foram tratados com probucol (11,8 mg/kg por 21 dias, na água de beber) ou succinobucol (10 mg/kg por 15 dias, i.p.) e, uma semana antes do término do tratamento com estes compostos e das avaliações comportamentais e bioquímicas, os animais receberam uma única administração intracerebroventricular (i.c.v., 40 ou 60 µg por sítio) de 6-OHDA. Após os tratamentos, parâmetros locomotores e bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo, assim como os níveis de tirosina hidroxilase e sinaptofisina estriatais foram avaliados como indicativos de toxicidade. Camundongos que receberam 6-OHDA apresentaram hiperlocomção, déficit de coordenação motora e/ou sinais de degeneração estriatais. No protocolo experimental no qual utilizou-se a dose mais alta de 6-OHDA (60 µg/sítio) observou-se hiperlocomção, redução da atividade da enzima superóxido dismutase e aumento da peroxidação lipídica, aumento da atividade da catalase no estriado e redução da imunorreatividade contra TH e sinaptofisina. Notavelmente, o probucol protegeu contra hiperlocomção, contra peroxidação lipídica estriatal, aumento da atividade da catalase, assim como protegeu contra a diminuição dos níveis de TH no estriado. O succinobucol protegeu parcialmente contra a perda da coordenação motora observada em animais expostos a 6-OHDA (dose de 40 µg/sítio). Realizou-se também um estudo *in vitro* no qual células de neuroblastoma humano da linhagem SY-SY5Y foram expostas à 6-OHDA. A toxina causou uma significativa inibição da viabilidade celular destas células. O probucol protegeu as células SH-SY5Y dos efeitos tóxicos de 6-OHDA quando

pré-incubado por 48h, embora não tenha sido observado efeito protetor significativo com pré-incubação por 24h. Os resultados do presente estudo mostram que o probucol e succinobucol protegem, ao menos em parte, contra a toxicidade induzida pela 6-OHDA em camundongos (modelo *in vivo*) ou células SH-SY5Y (modelo *in vitro*). Estes resultados apontam para estas substâncias como moléculas promissoras para estudos farmacológicos mais aprofundados na busca de novos tratamentos para condições neurotóxicas associadas ao estresse oxidativo, tais como a DP.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the degeneration of dopaminergic nigrostriatal neurons. Although the etiology of the majority of human PD cases is unknown, experimental evidence points to oxidative stress as an early and causal event. Probucol and its derivative succinobucol are lipid-lowering phenolic compounds with anti-inflammatory and antioxidant properties that have been recently reported as protective in neurotoxicity and neurodegeneration models. This study was designed to investigate the effects of these substances on the vulnerability of nigrostriatal dopaminergic neurons to oxidative stress in an *in vivo* and *in vitro* model using 6-OHDA neurotoxin, which is used in PD modelling. Swiss mice were treated with probucol (11.8 mg/kg for 21 days, in drinking water) or succinobucol (10 mg/kg for 15 days, *i.p.*) and one week before the end of treatment with these compounds and behavioral and biochemical assessments, mice received a single intracerebroventricular (*i.c.v.*, 40 or 60 µg/site) infusion of 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Locomotor performances, striatal oxidative stress-related parameters, and striatal tyrosine hydroxylase and synaptophysin levels were measured as outcomes of toxicity. 6-OHDA-infused mice showed hyperlocomotion or lack of coordination and signs of striatal degeneration. In one of the protocols, the higher dose of 6-OHDA (60 µg/site), mice showed reduced superoxide dismutase activity and increased lipid peroxidation and catalase activity in the striatum. Notably, probucol protected against 6-OHDA-induced hyperlocomotion and striatal lipid peroxidation, catalase upregulation and decrease of TH levels. Succinobucol partially protected against decreased motor coordination in mice exposed to 40 µg/site. We also conducted an *in vitro* study in which human neuroblastoma cell (strain SY-SY5Y) were exposed to 6-OHDA. The toxin caused a significant inhibition of cell viability of these cells. Probucol protected SH-SY5Y cells from the toxic effects of 6-OHDA when pre-incubated for 48 h, although no significant protective effect was observed with pre-incubation for 24h. Overall, the present results show that probucol and succinobucol protects, at least in part, against 6-OHDA-induced toxicity in mice (*in vivo* models) or cells (*in vitro* model). These findings may render these substances as promising molecules for further pharmacological studies on the search for disease-modifying treatment for neurotoxic conditions associated with oxidative stress, such as PD.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Mecanismo de ação da 6-OHDA	6
Figura 2 - Teste do alcance da pastilha de comida	24
Figura 3 - Efeito do tratamento com probucol na locomoção espontânea	33
Figura 4 - Enzimas antioxidantes	35
Figura 5 - <i>Western Blotting</i>	37
Figura 6 - GR e GPx	38
Figura 7 - Teste do campo aberto e teste da inversão da grade	39
Figura 8 - Teste do alcance da pastilha de ração	40
Figura 9 - Avaliação do estresse oxidativo	42
Figura 10 - <i>Western Blotting</i>	43
Figura 11 - Curvas de concentração e tempo	45
Figura 12 - Efeito do probucol sobre a viabilidade celular	46
Figura 13 - Efeito temporal da adição de probucol às células expostas à 6-OHDA	47

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Estruturas químicas da DA e da 6-OHDA	5
Tabela 2 - Farmacocinética do probucol	9
Tabela 3 - Estruturas químicas do probucol e succinobucol	16
Tabela 4 - Variação do peso corporal no protocolo experimental II, e níveis plasmáticos de colesterol e glicose	44

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -	Linha do tempo descritiva das fases experimentais ao longo do tratamento de avaliação dos efeitos do probucol em camundongos lesionados pela 6-OHDA	18
Esquema 2 -	Linha do tempo descritiva das fases experimentais ao longo do tratamento de avaliação dos efeitos do succinobucol em camundongos lesionados pela 6-OHDA	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido ascórbico

ANOVA – Análise de variância

CAT – Catalase

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DA – Dopamina

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DP – Doença de Parkinson

EGTA – Ácido etileno glicol tetracético

EPM – Erro padrão da média

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GPx – Glutathionaperoxidase

GR – Glutathionaredutase

GSSG – Glutathiona oxidada

HDL – Lipoproteína de alta densidade

i.c.v. – Intracerebroventricular

i.p. – Intraperitoneal

LDH – Lactato desidrogenase

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

MDA – Malondialdeído

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzida

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS – Salina tamponada com fosfato

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	DOENÇA DE PARKINSON (DP)	1
1.1.1	Tratamento farmacológico atual da doença de Parkinson	2
1.1.2	Estresse oxidativo na DP	2
1.1.3	Modelos experimentais na DP	4
1.1.3.1	A neurotoxina 6-hidroxidopamina	5
1.2	PROBUCOL E SUCCINOBUCOL	7
1.2.1	Propriedades farmacocinéticas do probucol	8
2	JUSTIFICATIVA	11
3	OBJETIVOS	13
3.1	OBJETIVOS GERAIS	13
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4	MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1	REAGENTES	15
4.2	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	16
4.2.1	Animais	16
4.2.2	Protocolos Experimentais	16
4.2.2.1	Protocolo Experimental I	16
4.2.2.2	Protocolo Experimental II	18
4.2.3	Lesão com 6-hidroxidopamina	20
4.2.4	Análises comportamentais	21
4.2.4.1	Teste da caixa de atividade	21

4.2.4.2	Teste do campo aberto	22
4.2.4.3	Teste do alcance da pastilha de ração (<i>single-pellet reaching</i>)	22
4.2.4.4	Teste da inversão da grade (<i>hang test</i>)	23
4.2.4.5	Teste da barra rotatória (<i>Rotarod</i>)	24
4.2.5	Análises bioquímicas dos experimentos <i>ex vivo</i>	24
4.2.5.1	Preparação tecidual para as análises bioquímicas	24
4.2.5.2	Avaliação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)	25
4.2.5.3	Avaliação da atividade da Glutathione Redutase (GR)	25
4.2.5.4	Avaliação da atividade da catalase (CAT)	25
4.2.5.5	Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	26
4.2.5.6	Avaliação da atividade da NADH desidrogenase	26
4.2.5.7	Avaliação da concentração de MDA	26
4.2.5.8	Avaliação do colesterol total e glicose plasmáticos	27
4.2.6	<i>Western blotting</i>	27
4.2.7	Dosagem de proteínas	28
4.3	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	28
4.3.1	Cultivo das células SH-SY5Y	28
4.3.2	Tratamento da linhagem celular com a neurotoxina	28
4.3.3	Ensaio de citotoxicidade celular	29
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30

5	RESULTADOS	31
5.1	CAPÍTULO I: PROBUCOL GERA NEUROPROTEÇÃO NUM MODELO EM CAMUNDONGOS DA DOENÇA DE PARKINSON UTILIZANDO-SE A 6-OHDA	31
5.1.1	O probucol previne a hiperlocomação induzida pela 6-OHDA	31
5.1.2	O probucol previne o estresse oxidativo induzido pela 6-OHDA no estriado	32
5.1.3	O Probucol diminui sinais de toxicidade nigro-estriatal induzidos pela 6-OHDA	35
5.2	CAPÍTULO II: EFEITOS DO SUCCINOBUCOL EM CAMUNDONGOS LESIONADOS COM 6-OHDA	36
5.2.1	6-OHDA afeta a coordenação motora, mas não afeta a atividade locomotora ou força dos camundongos	36
5.2.2	Succinobucol protege parcialmente os efeitos da 6-OHDA na coordenação motora	38
5.2.3	A dose de 40 µg/sítio i.c.v. de 6-OHDA não evidencia sinais de estresse oxidativo ou toxicidade no estriado	39
5.2.4	Efeitos sistêmicos do succinobucol nos camundongos	41
5.3	CAPÍTULO III: EFEITO PROTETOR DO PROBUCOL EM CÉLULAS SH-SY5Y EXPOSTAS A NEUROTOXINA 6-OHDA	42
5.3.1	Efeito da 6-OHDA na viabilidade celular	42
5.3.2	O probucol não interfere na sobrevivência celular	43
5.3.3	O pré-tratamento por 48h com probucol reverte em parte os efeitos tóxicos da 6-OHDA	44

6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE PARKINSON (DP)

A doença de Parkinson (DP) é uma doença crônica neurodegenerativa progressiva, caracterizada por sintomas motores graves, incluindo tremor de repouso, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural (LANG; LOZANO, 1998), bem como os sintomas não motores, tais como distúrbios olfativos, desordens do sono REM, depressão, ansiedade e perturbações urinárias e sexuais (MAYEUX, 2003; SPICA et al., 2012). Esta doença foi inicialmente descrita com maiores detalhes em 1817 pelo médico londrino James Parkinson (1755-1824) (PARKINSON, 2002) que, a princípio, chamou-a de “paralisia agitante” (*shaking palsy*, do inglês). Para Parkinson, a doença tinha características motoras, como o tremor de repouso e alterações da marcha, e não motoras na progressão da doença, como a incontinência urinária. O neurologista francês Jean-Martin Charcot (1825-1893) foi o responsável por batizar a patologia por “doença de Parkinson”, tal qual a conhecemos atualmente, homenageando James Parkinson. Charcot, trabalhando no Hospital de Salpêtrière (Paris, França), contribuiu muito no entendimento desta doença, principalmente por diferenciá-la da esclerose múltipla (GOETZ, 2002). A DP tem o avanço da idade como principal fator de risco para a doença, com uma incidência que aumenta de 17,4/100.000 pessoas entre 50 a 59 anos para 93,1/100.000 pessoas dos 70 aos 79 anos de idade (LEES; HARDY; REVESZ, 2009). Portanto, a DP, assim como a doença de Alzheimer, é uma das doenças mais comumente relatadas na clínica neurológica (MAYEUX, 2003).

A característica patológica principal de DP é uma profunda perda de neurônios produtores de dopamina na substância negra *pars compacta* (SNpc), localizada no mesencéfalo, que resulta em uma redução drástica da dopamina no estriado (HIRSCH; GRAYBIEL; AGID, 1988; SCHAPIRA, 2009). Apesar de haver algumas formas da DP que são de origem genética, a maior parte dos casos é de origem idiopática (causa incerta), sendo provavelmente resultado de efeitos combinados de múltiplos fatores, incluindo predisposição, envelhecimento, e exposições a contaminantes ambientais (OBESO et al., 2010).

Histopatologicamente, a DP se caracteriza pela presença dos corpos de Lewy, decorrentes da agregação anormal da proteína α -sinucleína (LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002), que quando associada a outros componentes como neurofilamentos fosforilados e ubiquitina,

transformam-se gradualmente em agregados proteico insolúveis (BRAAK; BRAAK, 2000; VON BOHLEN UND HALBACH; SCHOBER; KRIEGLSTEIN, 2004).

1.1.1. Tratamento farmacológico atual da doença de Parkinson

A principal terapia para a DP é baseada na reposição de dopamina, uso de agonistas dopaminérgicos, inibidores da enzima monoamina oxidase e/ou antagonistas de receptores colinérgicos, destinados a contrabalancear o desequilíbrio neuroquímico provocado principalmente pela degeneração da via nigroestriatal dopaminérgica (SCHAPIRA, 2009). Esta abordagem é considerada satisfatória, apesar de ser apenas sintomática e apresentar alguns efeitos colaterais. Além disso, é um tratamento farmacológico que não mudou substancialmente nos últimos 30 anos e não tem nenhuma eficácia comprovada para a progressão da doença (DEXTER; JENNER, 2013).

Conseqüentemente, a progressão da doença não é bloqueada por nenhum recurso terapêutico disponível e, conforme a doença evolui, faz-se necessária a administração de doses cada vez maiores dos fármacos paliativos (FACTOR, 2008). Novas estratégias de neuroproteção sustentam a aplicação de sequestradores de espécies reativas do oxigênio, quelantes de metais de transição (por exemplo, ferro e cobre), antiinflamatórios não esteroidais, antioxidantes naturais (por exemplo, polifenóis) e drogas antiapoptóticas, em monoterapia ou como parte de uma formulação de um coquetel antioxidante (MANDEL; YODIM, 2004). Além disso, a etiologia multifatorial da DP sugere que drogas com múltiplos alvos terapêuticos, tais como os antioxidantes, moduladores enzimáticos e anti-inflamatórios poderiam apresentar um potencial terapêutico na DP.

1.1.2. Estresse Oxidativo na DP

Um dos mecanismos básicos propostos para o dano celular da via nigro-estriatal na DP é o estresse oxidativo (JENNER, 2003; ZHOU; HUANG; PRZEDBORSKI, 2008), resultante da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) que excede a capacidade antioxidante celular. Neurônios dopaminérgicos da substância negra estão particularmente expostos ao estresse oxidativo porque o metabolismo da dopamina dá origem a várias moléculas pró-oxidantes (LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002). Especificamente, a dopamina pode auto-oxidar-se em espécies tóxicas de quinonas, gerando radical

superóxido (O_2^\bullet) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GRAHAM et al., 1978). Além disso, um estado de maior produção de espécies reativas também é desencadeado pelo envelhecimento do cérebro, pela predisposição genética, por disfunção mitocondrial e por toxinas ambientais (FUKAE; MIZUNO; HATTORI, 2007; HENCHCLIFFE; BEAL, 2008; LANGSTON, 1996; ZHOU; HUANG; PRZEDBORSKI, 2008). Por conseguinte, uma das primeiras alterações bioquímicas observadas na DP é uma redução dos níveis de glutatona (GSH; principal antioxidante intracelular de baixo peso molecular) na SNpc, resultando em um decréscimo seletivo na atividade do complexo I mitocondrial e em uma significativa redução na função mitocondrial geral (CHINTA; ANDERSEN, 2006, 2008; MARTIN; TEISMANN, 2009). Além disso, a atividade de enzimas antioxidantes em pacientes encontra-se diminuída (ABRAHAM et al., 2005). Outro evento que sugere que o estresse oxidativo participa na perda de neurônios na DP provém de estudos utilizando a toxina indutora de parkinsonismo denominada 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (BOVÉ; PERIER, 2012).

As evidências da importância do estresse oxidativo na evolução desta patologia levaram ao desenvolvimento de estudos experimentais com antioxidantes e pró-fármacos mitocondriais, com a última classe mostrando alguns resultados promissores (SHULTS et al., 2002). Estudos experimentais têm investigado o potencial neuroprotetor de moléculas com propriedades antioxidantes, quelantes e anti-inflamatórias em modelos experimentais da DP (MANDEL; YODIM, 2004). No entanto, um estudo clínico realizado há alguns anos atrás com a vitamina E para DP que avaliou a progressão dos sintomas, falharam em comprovar sua eficácia (PARKINSON STUDY GROUP, 1993).

As células possuem enzimas antioxidantes, como a catalase, superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR), que desempenham papel importante na defesa contra danos oxidativos, ao detoxificarem as EROs (MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; NÚÑEZ DE CASTRO, 1999). A SOD converte os radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e a catalase e a GPx estão envolvidas na detoxificação de H_2O_2 . A GPx oxida glutatona reduzida neste processo ($2 \text{ GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{ H}_2\text{O}$), que por sua vez é convertida de volta para a sua forma reduzida numa reação catalisada pela GR (DRINGEN; HIRRLINGER, 2003).

1.1.3. Modelos Experimentais na DP

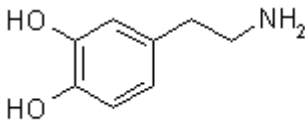
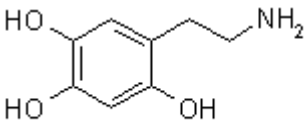
Os modelos experimentais são ferramentas para se estudar uma determinada doença. Eles podem ser modelos fiéis, que são os que reproduzem as características da doença original em estudo, ou modelos discriminatórios, que são os modelos que reproduzem apenas uma ou algumas características da doença (BOVÉ; PERIER, 2012). Para a DP, ainda se busca um modelo de fidelidade (tem-se conseguido apenas com os modelos geneticamente modificados, mesmo assim com algumas diferenças para a doença humana); porém, o mais comum e tradicional são os modelos que reproduzem apenas algumas características da DP. Contudo, os modelos discriminatórios podem ser úteis para se estudar e entender o curso das doenças, mesmo sem apresentar todas as características desta. Os modelos experimentais da doença de Parkinson visam, portanto, reproduzir as alterações patológicas ou comportamentais da doença humana nos animais experimentais (geralmente roedores e primatas não-humanos). A maioria destes modelos baseiam-se na administração sistêmica ou local (intracerebral) de neurotoxinas capazes de induzir seletiva degeneração do sistema nigrostriatal (BOVÉ; PERIER, 2012).

A avaliação motora é importante para análises de modelos da DP quando se quer observar efeitos nos sintomas motores da doença. O teste da barra rotatória (do inglês, *rotarod*) avalia déficits neurológicos que afetam as funções motoras em roedores (BROOKS; DUNNETT, 2009). Para que o camundongo não caia da barra rotatória, ele deve manter seu equilíbrio e para isto a coordenação motora do animal é testada. O campo aberto é um teste que avalia a atividade locomotora espontânea ao se registrar os movimentos dos animais em termos de cruzamentos de linhas marcadas em uma arena aberta. No início do teste, o camundongo é colocado no centro da arena e, então, começa a explorar o ambiente em torno de toda a arena (BROOKS; DUNNETT, 2009). O teste da inversão da grade avalia a integridade da força neuromuscular nos camundongos, pois eles devem permanecer agarrados à grade invertida por um determinado período (BROOKS; DUNNETT, 2009; TILLERSON; MILLER, 2003). O teste do alcance da pastilha de ração (*single-pellet reaching test*) avalia a coordenação motora do animal, observando os sucessos e fracassos ao pegar uma pastilha de ração com a pata dianteira através de uma estreita fenda numa caixa de acrílico (ORDOÑEZ-LIBRADO et al., 2008).

1.1.3.1. A neurotoxina 6-hidroxidopamina

A 6-OHDA é uma neurotoxina muito utilizada em modelos experimentais da doença de Parkinson baseados em roedores e primatas não-humanos (macacos). Ela é um análogo hidroxilado de dopamina (tabela 1) que utiliza o mesmo sistema de transporte do metabólito endógeno (transportador de dopamina, ou DAT) para adentrar células dopaminérgicas, produzindo a degeneração desses neurônios (BOVÉ; PERIER, 2012). O mecanismo tóxico deste composto é dependente da sua oxidação, levando à produção de quinona e H_2O_2 , $\bullet\text{O}_2^-$, e radical hidroxil ($\text{OH}\bullet$) (GLINKA; GASSEN; YODIM, 1997; KUMAR; AGARWAL; SETH, 1995; SANER; THOENEN, 1970). Além da produção direta de espécies reativas de oxigênio, está também relatado que a 6-OHDA inibe diretamente o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (GLINKA; TIPTON; YODIM, 1996). A figura 1 ilustra o mecanismo de ação, os alvos e consequências celulares dessa neurotoxina.

Tabela 1: Estruturas químicas da dopamina e da 6-hidroxidopamina.

Dopamina	6-Hidroxidopamina
	

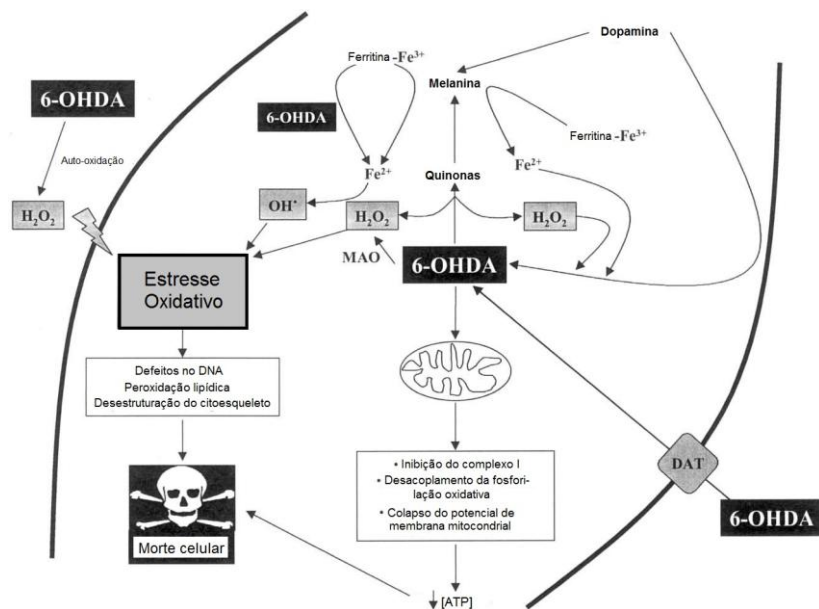


Figura 1: Mecanismo de ação da 6-OHDA (adaptado de BLUM et al., 2001).

A 6-OHDA é utilizada como modelo experimental da DP porque reduz os níveis estriatais de dopamina e produz uma perda massiva de neurônios dopaminérgicos. Apesar de bem caracterizado e poder ser utilizado como modelo experimental da DP em roedores e primatas não-humanos, o modelo da 6-OHDA apresenta algumas limitações já que esta substância não ultrapassa a barreira hematoencefálica (BHE) e necessita de administração intracerebral para causar neurotoxicidade (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Desta forma, ela deve ser administrada diretamente no sistema nervoso central (SNC) para causar efeitos neurotóxicos (BOVÉ et al., 2005). Além disso, como possui similaridade química às catecolaminas, é necessária a proteção de neurônios noradrenérgicos para a seletiva toxicidade dopaminérgica. A desipramina é um exemplo de fármaco inibidor da recepção de noradrenalina que minimiza a entrada da 6-OHDA nos neurônios noradrenérgicos, que tem sido utilizada previamente à administração da neurotoxina em modelos experimentais (BLUM et al., 2001).

1.2. PROBUCOL E SUCCINOBUCOL

O probucol é um fármaco fenólico desenvolvido em 1970 e utilizado para o tratamento da hipercolesterolemia (BARNHART; SEFRANKA; DAVID D MCINTOSH, 1970). Esta substância também possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes e tem uma longa história de uso clínico para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares. Em 1995, porém, vários países interromperam o uso do probucol na clínica médica devido a alguns efeitos colaterais, como a redução dos níveis plasmáticos da lipoproteína de alta densidade (HDL) e ocorrência de arritmias cardíacas observadas pelo prolongamento do intervalo QT (TARDIF; GRÉGOIRE; L'ALLIER, 2002). Entretanto, apesar disso, ele ainda é utilizado clinicamente no Japão e suas propriedades farmacológicas continuam sendo avaliadas em estudos experimentais e clínicos (POIRIER, 2005; YAMAMOTO, 2008). Um estudo clínico do uso do probucol em pacientes foi cuidadosamente acompanhado durante 15 anos (01/01/1984 a 31/12/1999), denominado POSITIVE (YAMASHITA et al., 2008). Esse estudo, porém, observou vantagens na utilização do probucol em pacientes com hipercolesterolemia familiar na prevenção de doenças coronarianas e não apresentou o efeito adverso severo de cardiotoxicidade na redução do intervalo QT (YAMASHITA et al., 2008).

O mecanismo de ação para o efeito hipolipidêmico do probucol ainda não está bem elucidado. Porém, alguns mecanismos foram propostos para explicar a redução do colesterol plasmático desse composto, tais como o aumento da excreção do colesterol pela bile (TAWARA; TOMIKAWA; ABIKO, 1986), e a ação anti-aterogênica e antioxidante do probucol, onde Carew e colaboradores mostraram que o fármaco diminui a oxidação da LDL na placa de ateroma rica em macrófagos e com isso diminui a progressão da aterosclerose (CAREW; SCHWENKE; STEINBERG, 1987).

Um derivado do probucol chamado de succinobucol (AGI-1067), que é um éster ácido monossuccínico, está sendo testado em estudos pré-clínicos e tem apresentado propriedades farmacológicas e eficácia terapêutica semelhantes ao probucol, porém com melhor resposta anti-inflamatória e maior potencial para ser utilizado como fármaco antiaterosclerótico (KUNSCH et al., 2004), pois inibe a cascata oxidativa-inflamatória com seu mecanismo antioxidante (DAVIDSON et al., 2007).

Além disso, o probucol e o succinobucol têm sido relatados também por seus efeitos protetores em modelos experimentais de

neurotoxicidade e neuropatologia (AL-MAJED, 2011; COLLE et al., 2012, 2013; SANTOS et al., 2012). De maneira mais específica para este trabalho, estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram (i) efeitos neuroprotetores contra perda sináptica e prejuízos cognitivos induzidas pelo peptídeo β -amilóide ($A\beta_{1-40}$) em camundongos (SANTOS et al., 2012), (ii) probucol e succinobucol com efeitos benéficos contra o estresse oxidativo e excitotoxicidade em modelos *in vitro* da doença de Huntington (COLLE et al., 2012, 2013), e (iii) os efeitos de proteção contra a neurotoxicidade induzida por metilmercúrio (MeHg), que foram significativamente mais elevados em comparação com antioxidantes clássicos, tais como ácido ascórbico e trolox (FARINA et al., 2009). E de particular importância, o probucol ainda modulou positivamente a atividade da enzima glutathione peroxidase neste estudo (FARINA et al., 2009). Esta enzima é de crucial importância para a detoxificação de peróxidos no sistema nervoso central (DRINGEN; PAWLOWSKI; HIRRLINGER, 2005). Interessantemente, algumas evidências sugerem que a produção direta de peróxido de hidrogênio durante a formação de agregados de α -sinucleína pode ser um mecanismo molecular fundamental relacionado à patogênese da DP (TABNER et al., 2002). Ainda, outros estudos (RIDET et al., 2006; THIRUCHELVAM et al., 2005) demonstraram que a superexpressão da enzima glutathione peroxidase (GPx) preveniu a ocorrência de sintomas relacionados à DP em modelos experimentais desta desordem. Além disso, há evidências de que a atividade da enzima GPx está diminuída em pacientes da DP quando comparados com indivíduos normais (ABRAHAM et al., 2005).

1.2.1 Propriedades farmacocinéticas do probucol

A tolerabilidade e farmacocinética do probucol por administração oral múltipla em indivíduos saudáveis do sexo masculinos foi recentemente avaliada (JEON et al., 2011). Este estudo avaliou três tipos de tratamentos: um de administração oral de 250 mg de probucol uma vez ao dia após o café da manhã (250 mg/d), um segundo grupo com administração de 500 mg uma vez ao dia após o café da manhã (500 mg/d), e um terceiro grupo que tomou 250 mg duas vezes por dia, após café da manhã e jantar (500 mg/d) durante 14 dias. Os valores da área sob a curva (AUC) da concentração de probucol plasmáticos do estudo citado encontram-se na tabela 2 a seguir. Os autores concluíram que não ocorreram alterações clinicamente significativas na avaliação dos exames de eletrocardiograma dos voluntários, incluindo prolongamento

do intervalo QT que é relatado como efeito adverso do fármaco, e que todos os eventos adversos foram leves e sem alterações clinicamente significativas, descartando eventos de intolerabilidade.

Tabela 2: Farmacocinética do probucol

Regime de doses	AUC média	Índice de acumulação *
250 mg 1 x/dia	123,8 $\mu\text{g}\times\text{h/l}$	2,5
500 mg 1 x/dia	198,5 $\mu\text{g}\times\text{h/l}$	2,85
250 mg 2 x/dia	244,7 $\mu\text{g}\times\text{h/l}$	4,21

* Índice de acumulação: razão AUC do último dia pela AUC do primeiro dia.

2. JUSTIFICATIVA

A DP possui uma elevada incidência na população mundial, com impacto cada vez maior devido ao envelhecimento populacional. A sua patogênese parece envolver a produção de espécies reativas de oxigênio e enzimas antioxidantes, como a GPx, possuem atividade reduzida em pacientes. Além disso, ainda se busca uma terapia que impeça a progressão da neurodegeneração.

O probucol e o succinobucol possuem propriedades antioxidantes e, além disso, o probucol já é usado em humanos apresentando promissores efeitos anti-aterogênicos, antioxidantes e anti-inflamatórios. Por outro lado, o succinobucol é um derivado estável do probucol, com propriedades antidiabéticas e efeitos colaterais menos evidentes quando comparado ao composto padrão (probucol).

Por esse exposto, o proposto trabalho justifica-se em investigar o possível efeito benéfico (por um protocolo experimental de avaliação profilática e preventiva) dos compostos probucol e succinobucol em modelos experimentais (*in vitro* e *in vivo*) da doença de Parkinson utilizando a 6-OHDA, que representa uma molécula pró-oxidante.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Esta tese objetivou oferecer um melhor conhecimento acerca da toxicidade induzida pela neurotoxina 6-hidroxidopamina (quando injetada intracerebroventricularmente) em camundongos Swiss e quando incubada com células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), além de avaliar o possível efeito protetor do probucol e do succinobucol contra esta neurotoxina.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desta tese são:

- I) Investigar os efeitos do probucol contra a neurotoxicidade induzida pela administração intracerebroventricular de 6-OHDA em camundongos por parâmetros comportamentais e bioquímicos;
- II) Investigar os efeitos do succinobucol contra a neurotoxicidade induzida pela administração intracerebroventricular de 6-OHDA em camundongos por parâmetros comportamentais e bioquímicos;
- III) Avaliar, através de estudos *in vitro* com cultura de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), o possível efeito protetor do probucol sobre a citotoxicidade induzida por 6-OHDA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES:

As estruturas químicas dos compostos avaliados nesta tese estão mostradas na tabela 3. O probucol foi adquirido da empresa da Sigma (St.Louis, MO, USA) e o succinobucol foi sintetizado de acordo com artigo anterior de nosso grupo de pesquisa (COLLE et al., 2013), gentilmente produzido e disponibilizado pelo laboratório de química orgânica do professor Dr. Antônio Luiz Braga, do Departamento de Química da UFSC.

Tabela 3: Estruturas químicas do probucol e do succinobucol.

	Estrutura química
Probucol	
Succinobucol	

Cloridrato de 6-hydroxydopamina, desipramina, ácido ascórbico, nicotinamida adenina dinucleotídeoofostato reduzida, glutatona oxidada, glutatona redutase, glutatona reduzida, albumina de soro bovino e dimetilsulfóxido (DMSO) também foram comprados da empresa Sigma, acima citada. Ácido acético, ácido clorídrico concentrado, ácido tricloroacético, fosfato de potássio dibásico, fosfato

de potássio monobásico foram adquiridos da empresa Vetec. Anticorpos anti-tirosina hidroxilase (sc-7847), anti-sinaptofisina (sc-9116) e anti- β -actina (sc-4778) foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

4.2. ENSAIOS *IN VIVO*:

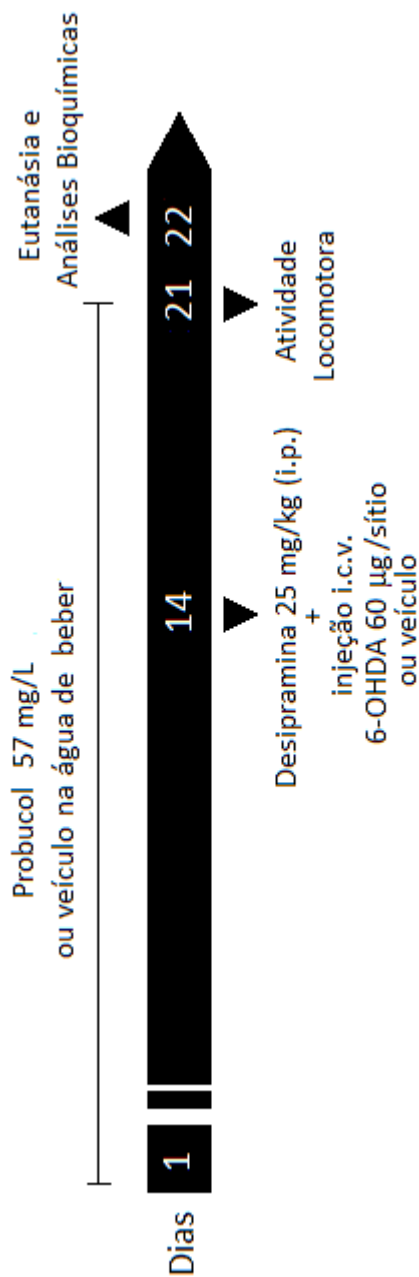
4.2.1. Animais:

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos adultos, provenientes do Biotério Central da UFSC, com 3 meses de idade e pesando entre 35 - 45 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada de 22 \pm 2 °C e ciclo claro/escuro 12:12 horas (7:00-19:00 h). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob os protocolos de números PP00546.

4.2.2. Protocolos experimentais

4.2.2.1 Protocolo experimental I:

Com o objetivo de investigar o efeito do probucol sobre o efeito de uma exposição aguda de 60 μ g de 6-OHDA (injetada diretamente no ventrículo lateral de camundongos) na atividade locomotora e em parâmetros do estresse oxidativo estriatais, foi utilizado o seguinte protocolo experimental (ver Esquema 1):



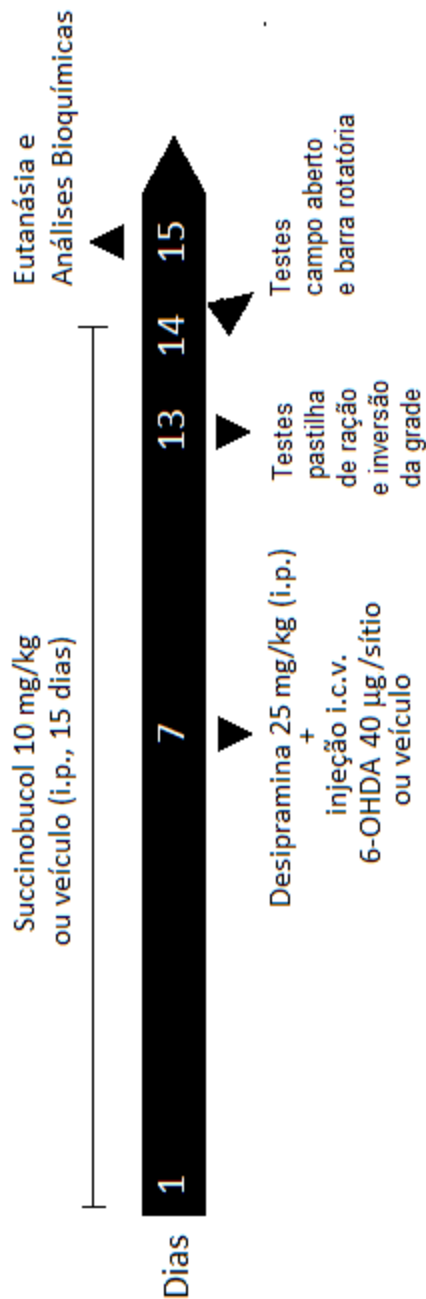
Esquema 1: Linha do tempo descritiva das fases experimentais ao longo do tratamento de avaliação dos efeitos do probucol em camundongos lesionados pela 6-OHDA.

Trinta camundongos foram divididos em 4 grupos (n = 7-8 animais): (1) Controle, (2) 6-OHDA, (3) Probucol e (4) Probucol + 6-OHDA. Os animais dos grupos 3 e 4 receberam na água de beber, uma solução de probucol (57 mg/L) em 1% de DMSO *ad libitum*, como única fonte de líquido, durante 21 dias. Os grupos 1 e 2 foram tratados com veículo (1% de DMSO, *ad libitum*) durante 21 dias. Para camundongos tratados com probucol (grupos 3 e 4), foi calculada, com base na sua ingestão de líquidos por dia ($9,5 \pm 0,9$ ml/animal), uma dose diária média do fármaco que ficou em 11,8 mg/kg. A ingesta líquida dos animais (grupos 1 a 4) não foi diferente da de um grupo paralelo de animais que receberam apenas água da torneira (dados não mostrados). Duas semanas após o início do tratamento com o probucol ou veículo, os camundongos receberam uma única injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de 6-OHDA (60 µg/sítio em volume total de 3 µL; ver item "lesões de 6-hidroxidopamina") e houve continuação do tratamento com probucol por mais uma semana, totalizando 21 dias. A dose de probucol para este tratamento foi baseada em um estudo anterior do nosso grupo (SANTOS et al., 2012), que mostrou um efeito protetor do probucol em um modelo experimental da doença de Alzheimer. Neste estudo citado, foi administrado 10 mg/kg i.p. de probucol, por isso, fez-se uma solução a 57 mg/L para tentar uma dose de aproximadamente 10 mg/kg pela ingesta hídrica dos animais, pois consideramos que cada animal consuma aproximadamente 7 mL de água por dia.

No 21º dia do tratamento a atividade locomotora foi avaliada e no 22º dia, os animais foram anestesiados e mortos por decapitação. O estriado foi dissecado e preparado para avaliações enzimáticas de estresse oxidativo (glutathione redutase – GR, glutathione peroxidase – GPx, catalase – CAT e superóxido dismutase – SOD), assim como para a quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e também avaliação da imunorreatividade para TH e sinaptofisina por *western blot*.

4.2.2.2. Protocolo experimental II:

Com o objetivo de investigar o efeito do succinobucol sobre o efeito de uma exposição aguda de 40 µg de 6-OHDA (injetada diretamente no ventrículo de camundongos) foi utilizado o seguinte protocolo experimental (ver Esquema 2):



Esquema 2: Linha do tempo descritiva das fases experimentais ao longo do tratamento de avaliação dos efeitos do succinobucol em camundongos lesionados pela 6-OHDA.

Quarenta e três camundongos foram divididos em 4 grupos (n = 11-12 animais): (1) Controle, (2) Succinobucol, (3) 6-OHDA e (4) Succinobucol + 6-OHDA. Os animais dos grupos 2 e 4 receberam succinobucol (10 mg/kg, i.p.) durante 15 dias, enquanto os grupos 1 e 3 foram tratados com veículo (10% de DMSO em solução salina, i.p.) durante este mesmo período (esquema 2). Sete dias após o início do tratamento com o succinobucol ou veículo, os camundongos dos grupos 3 e 4 receberam uma única injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de 40 µg de 6-OHDA (ver item 4.2.3), enquanto os animais dos grupos 1 e 2 receberam o veículo (0,05% de ácido ascórbico em salina).

Nos dias de tratamento 13 e 14, os camundongos foram avaliados em relação às funções motoras e, após estas avaliações, foram mantidos em jejum por 10h para coleta sanguínea por punção cardíaca em tubos heparinizados para determinação dos níveis de colesterol e glicose. Em seguida, os animais foram mortos por decapitação e o estriado direito foi dissecado e homogeneizado para avaliação enzimática (glutathione redutase – GR, glutathione peroxidase – GPx) (n= 4-7 por grupo), assim como para a quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme procedimentos descritos mais adiante (item 4.2.5.1). Ou então, o estriado direito foi utilizado para fazer homogenato para *western blot* (n= 3-5 por grupo). O estriado esquerdo foi utilizado para medir a atividade da enzima NADH desidrogenase (n= 5-8, por grupo).

4.2.3. Lesão com 6-hidroxidopamina:

As administrações de 6-OHDA foram realizadas com procedimentos semelhantes nos dois protocolos experimentais *in vivo* relatados nesta tese, porém as doses foram diferentes. No protocolo experimental I (tratamento com probucol), a lesão com essa neurotoxina foi realizado com uma dose de 60 µg/sítio, enquanto que para o protocolo experimental II (tratamento com succinobucol), a dose escolhida foi de 40 µg/sítio. Essa diferença na dosagem teve como objetivo a redução da mortalidade dos animais, pois no primeiro protocolo experimental (dose de 60µg), perdemos ao todo 6 animais após a administração da 6-OHDA.

Os camundongos foram previamente tratados com probucol ou succinobucol, conforme descrito no item anterior. Trinta minutos antes da administração da 6-OHDA, os animais foram tratados com desipramina (25 mg/kg, i.p.) que é um fármaco inibidor da receptação de noradrenalina utilizado nos modelos experimentais desta neurotoxina

para proteger os neurônios noradrenérgicos contra a entrada de 6-OHDA, Sob anestesia de isoflurano, os animais dos grupos 2 e 4 do protocolo experimental I, receberam 60 µg de 6-OHDA (dissolvidos em 3 µL de solução salina contendo 0,05% de ácido ascórbico) no ventrículo lateral cerebral, enquanto os animais controle (grupos 1 e 3) receberam o mesmo volume do veículo (3 µL de solução salina contendo 0,05% de ácido ascórbico). No protocolo experimental II, os animais também receberam desipramina 25 mg/kg, 30 minutos antes da administração da 6-OHDA para proteger contra danos noradrenérgicos. Neste segundo protocolo, os animais dos grupos 3 e 4 receberam 40 µg/sítio de 6-OHDA (dissolvida em 3µL de solução salina contendo 0,05% de ácido ascórbico) no ventrículo lateral cerebral, enquanto os animais controle (grupos 1 e 2) receberam o mesmo volume do veículo (solução salina contendo 0,05% de ácido ascórbico). A 6-OHDA deve ser manipulada no escuro por ser fotossensível, assim como dissolvida em ácido ascórbico para manter sua estabilidade em solução por ser uma substância facilmente oxidada.

Resumidamente, em ambos protocolos experimentais os animais foram anestesiados com isoflurano (1 mL/mL; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda, RJ, Brasil), utilizando um sistema de vaporizador (SurgiVet Inc., WI, EUA) e, em seguida delicadamente com a mão foram realizadas as injeções i.c.v. (6-OHDA ou veículo) (HALEY; MCCORMICK, 1957; LAURSEN; BELKNAP, 1986).

A assepsia do local da injeção foi realizada utilizando uma gaze com etanol a 70 %. Sob anestesia leve (ou seja, apenas o necessário para a perda do reflexo postural), a agulha foi inserida unilateralmente 1 mm a direita do ponto da linha média equidistante de cada um dos olhos e de 1 mm posterior a uma linha desenhada através da base anterior dos olhos (usado como referência externa) com uma agulha hipodérmica (calibre 27,5) ligado a uma microseringa Hamilton de 10 µL. Essa técnica de administração é conhecida como *free-hand*. A acurácia do sítio de administração foi avaliada visualmente pela cicatriz deixada pela agulha no momento da dissecação do estriado.

4.2.4. Análises comportamentais

4.2.4.1. Teste da caixa de atividade

A atividade locomotora dos animais foi medida por um sistema de um contador digital que registra o número de interrupções do feixe luminoso na fotocélula oposta. A caixa era feita de madeira (70 x 30 x

22 cm), com um assoalho de tela de aço, que foi equipada com três raios infravermelhos horizontais paralelos a 3 cm de distância do chão e de modo uniforme ao longo do eixo longitudinal. O total da atividade locomotora foi monitorado durante 30 minutos (MOREIRA et al., 2010).

4.2.4.2. Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado para investigar a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais, de acordo com a metodologia descrita anteriormente (SANTOS et al., 2012). Os camundongos foram colocados no centro de uma arena circular azul (diâmetro = 44 cm, altura = 22 cm), com setores desenhados no chão. O número de cruzamentos (número de quadrados cruzados pelo animal com as quatro patas) foi utilizado para avaliar a atividade locomotora, e o número de levantadas (número de vezes que os animais se equilibram sobre as patas traseiras ou atividade exploratória vertical) para avaliar o comportamento exploratório. Todos os parâmetros foram registrados em um período de 5 min. O aparato foi higienizado com uma solução de etanol 10% entre os testes de cada animal, a fim de remover os odores ou pistas.

4.2.4.3. Teste do alcance da pastilha de ração (*single-pellet reaching*)

Este teste consiste em uma tarefa de execução de uma sequência complexa para avaliação da coordenação motora – começa com a olfação da pastilha de ração (o *pellet*) na parte da frente da câmara, seguido pelo movimento de levantamento da pata anterior, o ajuste postural para projetar a pata através de uma fenda estreita em direção a pastilha de comida até alcançar o alvo (Fig. 2A).

A câmara consiste em uma caixa de acrílico medindo 19,5 cm de comprimento, 8 cm de largura e 20 cm de altura. Na parte frontal, existe uma fenda vertical de 1 cm de largura e 15 cm de altura. Um suporte de 0,2 cm de espessura, 8 cm de comprimento e 2 cm de largura, situado a 1,1 cm do chão, na frente da câmara é o local onde é apresentada a pastilha de comida ao camundongo (figura 2B).

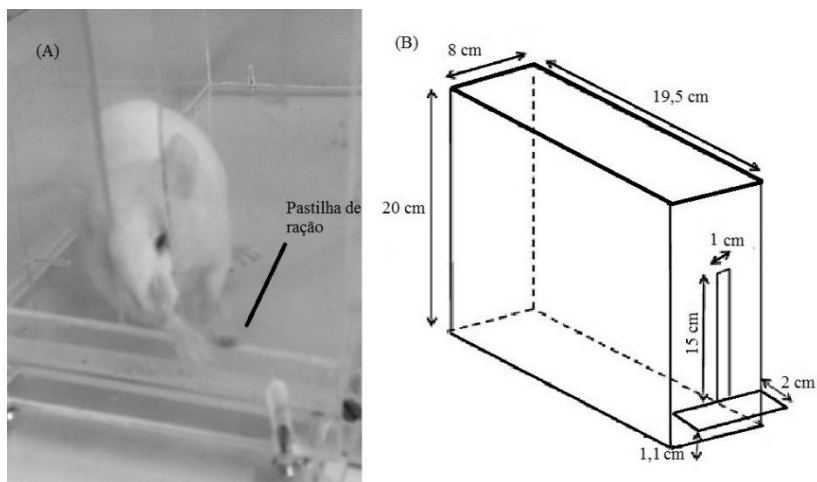


Figura 2: Teste do alcance da pastilha de comida. (A) Camundongo no momento em que alcança a pastilha de comida através da estreita abertura anterior da câmara de testes. (B) Esquema da câmara de testes.

Antes da realização do teste, os animais devem passar por 4 dias prévios de treinamento e, para isto, eles devem ficar em jejum por 24 horas. Para a realização do treinamento, as pastilhas de ração com 20 mg devem ser posicionadas no espaço denteado, distante 1 cm da fenda e de forma central às extremidades. Os animais devem ser treinados individualmente durante 10 minutos. Durante o treino, cada animal deveria pegar dez pastilhas de ração, de modo que se o animal conseguisse agarrar a ração através da fenda, sem deixar que a mesma caísse no chão, a tentativa seria considerada bem sucedida (“S”). No entanto, se o animal batesse na pastilha de ração sem pegá-la ou a deixasse cair após pegá-la, a tentativa era considerada como fracassada (“F”) (FARR; WHISHAW, 2002). A avaliação consiste em analisar o “desempenho de sucessos” (DS), que é um índice dado pela fórmula: $DS = S/(S+F)$. Este teste foi realizado como descrito previamente (ORDOÑEZ-LIBRADO et al., 2008).

4.2.4.4. Teste da inversão da grade (*hang test*)

Este teste avalia a perda da força neuromuscular do camundongo, pois eles devem conseguir se sustentar numa grade invertida sem cair por 30 segundos. Os camundongos foram colocados

em uma grade horizontal de malha de $0,5 \text{ cm}^2$, que então foi invertida de modo que os camundongos, para não cair, se agarram na grade com as patas dianteiras e traseiras, permanecendo pendurados de cabeça para baixo (TILLERSON; MILLER, 2003). A inversão da grade deve ocorrer a uma distância de 20 cm acima de uma superfície dura com maravalha, para desencorajar a queda ou ocorrerem ferimentos em caso de queda. O aparato foi equipado com uma parede de papelão com 10 cm de altura para impedir que os animais escalassem até a parte superior da grade. Os animais foram mantidos invertidos por até 30 segundos e são dadas 10 chances com intervalo de 1 minuto entre elas para se determinar o maior tempo de permanência. O maior valor foi o utilizado para o cálculo da porcentagem de tempo sem cair, que é registrado como o maior tempo/ $30 \text{ s} \times 100$ (MOHANASUNDARI et al., 2006).

4.2.4.5. Teste da barra rotatória (*Rotarod*)

Este é um teste comumente utilizado para avaliação da função motora em roedores. Utiliza-se uma haste rotatória de 3 cm de diâmetro, na qual o animal é colocado, devendo manter o seu equilíbrio. O tempo da primeira queda do camundongo é denominado de latência.

Neste trabalho, a velocidade de rotação da barra rotatória foi de 21 rpm, os camundongos foram testados durante um período de 4 minutos e, a cada queda, o cronômetro era parado, sendo retomado somente após a recolocada do animal na barra rotatória (MALAGUTTI et al., 2009; STRINGARI et al., 2006). Registrou-se a latência e o número total de quedas.

4.2.5. Análises bioquímicas dos experimentos *ex vivo*:

As atividades enzimáticas descritas a seguir (GPx, GR, CAT, SOD, e NADH desidrogenases) foram medidas utilizando-se o multileitor Infinite M 200 (Tecan®).

4.2.5.1. Preparação tecidual para as análises bioquímicas:

Após a análise comportamental, os animais foram submetidos à anestesia (isofurano, conforme previamente mencionado) e o sangue foi coletado por punção cardíaca e os estriados foram removidos e homogeneizados em 10 volumes de tampão HEPES 20 mM, pH 7,0. Os homogenatos foram centrifugados a $16.000 \times g$ a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante gerado foi utilizado nas análises para determinação da

atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e medida dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Para a determinação plasmática do colesterol total e da glicose, o sangue coletado com heparina e foi centrifugado a 800 x g. Após o plasma foi separado e estocado em freezer – 80 °C.

Para a determinação da atividade das enzimas NADH desidrogenases, os estriados foram homogeneizados em 10 volumes de tampão fosfato (pH 7,4), contendo 0,3 M de sacarose, 5 mM de MOPS, 1 mM de EGTA e 0,1% de albumina de soro bovino. Os homogenatos teciduais foram centrifugados a 1000 x g a 4°C durante 10 minutos e uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para a determinação da atividade dessa enzima (complexo 1 da cadeia respiratória mitocondrial).

4.2.5.2. Avaliação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx):

A atividade da GPx foi determinada através do método de Wendel, utilizando peróxido de *tert*-butila como substrato (WENDEL, 1981). A GPx catalisa a redução de H₂O₂, bem como outros peróxidos orgânicos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como co-substrato e produzindo glutathione oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida pela glutathione reductase com o consumo de NADPH, que foi mensurado através da leitura em espectrofotômetro em 340 nm. A atividade da GPx foi expressa em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

4.2.5.3. Avaliação da atividade da Glutathione Redutase (GR):

A atividade da GR foi determinada através do método descrito por Carlberg e Mannervik (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). A taxa de redução da glutathione oxidada (GSSG) foi determinada indiretamente através do monitoramento do consumo (oxidação) do NADPH a 340 nm. A atividade da GR foi expressa em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

4.2.5.4. Avaliação da atividade da Catalase (CAT):

A atividade da CAT foi medida pelo método de Aebi (AEBI, 1984). A reação foi iniciada pela adição de 300 mM de H₂O₂ e a taxa de consumo do H₂O₂ foi medida espectrofotometricamente a 240 nm.

4.2.5.5. Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD):

A atividade da SOD no homogenato do estriado foi determinada pelo método de Misra e Fridowich (MISRA; FRIDOVICH, 1972). Adicionando-se o homogenato que contém a enzima inibe a auto-oxidação da adrenalina que é monitorada espectrofotometricamente a 480 nm. Por definição, uma unidade da atividade enzimática é a quantidade de enzima capaz de produzir 50% de inibição da auto-oxidação da adrenalina. A atividade enzimática da SOD é expressa como unidade (U)/mg de proteína.

4.2.5.6. Avaliação da atividade da NADH desidrogenase:

O estriado do hemisfério cerebral esquerdo foi homogeneizado (1:10 p/v) em tampão fosfato 4,4 mM, pH 7,4, contendo 0,3 M de sacarose, 5 mM de MOPS, 1 mM de EGTA e 0,1% de albumina de soro bovino. Os homogenatos foram centrifugados a 1000 x g durante 10 min a 4 ° C. O sobrenadante obtido foi mantido a -80 ° C até a determinação da atividade da enzima.

A atividade do complexo I (NADH desidrogenases) foi medida através da taxa de redução do ferricianeto a 420 nm, dependente de NADH, como descrito anteriormente por Cassina e Radi (CASSINA; RADI, 1996). O método descrito foi modificado por Latini *et al* (LATINI *et al.*, 2005). As atividades dos complexos da cadeia respiratória foram calculados como nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

4.2.5.7. Avaliação da concentração de MDA

As substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas em homogenatos do estriado utilizando o método descrito por Ohkawa e colaboradores (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979), no qual o malondialdeído (MDA), um produto final de peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico para formar um complexo corado. As amostras foram incubadas a 100 °C durante 60 minutos em meio ácido, contendo sulfato de dodecil sódico a 0,45% e 0,67 % de ácido tiobarbitúrico. Após centrifugação, foi determinado o produto da reação espectrofotometricamente a 532 nm utilizando MDA como padrão em nmol/mg de proteína.

4.2.5.8. Avaliação do colesterol total e glicose plasmáticos

Os níveis de colesterol total no plasma e de glicose foram determinadas por um método enzimático baseado no sistema de oxidase / peroxidase usando kit comercial de reagentes (Labtest Diagnóstica ®, Lagoa Santa-MG, Brasil).

4.2.6. Western blotting:

Vinte e quatro horas após as análises comportamentais, 4 animais de cada grupo foram mortos para serem utilizados para a técnica de *western blotting*. Os animais foram mortos por decapitação e os estriados foram rapidamente removidos e homogeneizados em tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 7,5, X-100, NaCl 100 1% Triton, 5 mM de EDTA pH 8,0, 40 mM de β -glicerolfosfato, NaF 50 mM, ortovanadato 200 μ M, 5% de glicerol e inibidores de protease) e sonicados durante 5 min. As amostras foram centrifugadas a 13000 x g a 4°C durante 45 min e os sobrenadantes separados e dosados quanto ao conteúdo protéico. As amostras (40-50 μ g de proteína) foram submetidas à eletroforese em gel de SDS poliacrilamida (PAGE), utilizando géis a 12%, e após a separação eletroforética as proteínas foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 μ m de diâmetro). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas (1 h) com 5% de leite desnatado em TBS tween 0,05% (10 mM Tris, 150 mM de NaCl, pH 7,5) e incubadas *overnight* a 4° C, com os seguintes anticorpos: anticorpo anti-TH (1/2000; 62kDa), anticorpo anti-sinaptofisina (1/300; 38-48 kDa), e anticorpo anti- β -actina (1:3000; 43kDa), diluídos em tampão TBS-Tween-BSA (20 mM de Tris base, 140 mM de NaCl, 0,05% de Tween-20). Após as lavagens, as membranas foram incubadas durante 60 min à temperatura ambiente com os anticorpos secundários IgG conjugados com peroxidase: anti-coelho (SYP), anti-cabra (TH) or anti-camundongo (β -actina). A ligação específica do anticorpo foi revelada utilizando um kit quimioluminescente (sistema PerkinElmer ECL). Finalmente, as bandas foram analisadas quanto a densidade óptica utilizando-se o *software* Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) e os valores densitométricos das bandas foram normalizados em relação as bandas de β -actina. Para melhor visualização das diferenças, os resultados da análise estatística foram convertidos em valores percentuais em relação ao grupo controle (considerado 100%).

4.2.7. Dosagem de Proteínas:

O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Lowry (1951), usando albumina de soro bovino para curva padrão.

4.3. ENSAIOS *IN VITRO*:

Com o objetivo de investigar possíveis mecanismos de ação da 6-OHDA e do probucol em células do SNC, utilizamos um protocolo *in vitro* utilizando células de neuroblastoma humano linhagem SH-SY5Y.

4.3.1. Cultivo das células SH-SY5Y:

As células de neuroblastoma humano, denominadas SH-SY5Y, de procedência do Banco de células do Rio de Janeiro (UFRJ, Duque de Caxias, Rio de Janeiro), de código 0223. As células foram mantidas em placas de 10 mL em meio DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's Medium 1:1 Ham's F12; GIBCO, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino e foram mantidas em incubadora a 37°C, com 5% CO₂. A cada vez que atingia uma confluência de 70 a 80%, as células eram ressuspensas e repassadas a uma nova placa de 10 mL ou semeadas em placas de 96 poços numa densidade de 20.000 células por poço para realização dos experimentos de viabilidade celular. Trabalhou-se até as células atingirem a 25ª passagem (após esta passagem, as células eram descartadas e novo frasco de células criopreservadas era descongelado).

4.3.2. Tratamento da linhagem celular:

Para evidenciar a possível toxicidade da 6-OHDA, as células SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 20.000 células por poço e cultivadas em meio DMEN-F12 com 10% SFB. Após 24 horas (onde a confluência era cerca de 70%), a neurotoxina 6-OHDA (dissolvida em uma solução de ácido ascórbico 0,05%) foi adicionada às células SH-SY5Y em concentrações finais de 0; 10; 30; 60; 100 e 150 µM (curva concentração-resposta) para se estabelecer uma concentração tóxica significativamente diferente. Após 24 h, realizou-se dois testes de viabilidade celular: o teste da redução do MTT (MOSMANN, 1983) e o da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada para líquido sobrenadante (PETEGNIEF

et al., 2003). Após a escolha da concentração da neurotoxina que reduziu a viabilidade celular em 24h, fez-se uma curva de tempo, onde se avaliou o tempo que ocorriam a perda da viabilidade celular.

Uma curva concentração-resposta também foi realizada com o probucol, com a finalidade de se avaliar a possível neurotoxicidade do composto. Essa curva de probucol foi feita nas seguintes concentrações finais: 0; 1; 3; 10 e 30 μM . A concentração de probucol teve que ser feita nessa faixa devido a baixa solubilidade do probucol em solução aquosa.

Nos ensaios onde o probucol foi utilizado juntamente com a 6-OHDA, as células foram pré-tratadas ao probucol 48 e 24h antes da adição da neurotoxina, e também avaliou-se o co-tratamento, isto é, adição do fármaco e da toxina ao mesmo tempo.

4.3.3. Ensaios de citotoxicidade celular:

A viabilidade celular foi medida através do ensaio de avaliação da função mitocondrial pelo método de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), que é um ensaio que avalia a viabilidade metabólica das células. A técnica é baseada na medida da atividade de desidrogenases mitocondriais que clivam e reduzem o corante amarelo solúvel MTT em cristais de formazan insolúvel, que possui coloração violeta. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços ($0,8 \times 10^6$ células/mL) e colocadas em incubadora (5% CO_2 , 37 °C) por 24 h. Após este período, as células foram tratadas com diferentes concentrações de 6-OHDA (curva de concentração e curva de tempo), ou veículo (solução AA 0,05%). Após o período de 24h (curva de concentração) ou tempos crescentes (curva de tempo), o meio foi removido e 100 μL de MTT 0,5 mg/mL foram adicionados a cada poço e uma nova incubação por 2 h foi efetuada. Terminada esta etapa, o MTT foi removido e foram adicionados 200 μL de DMSO para dissolução dos cristais de formazan. As placas foram então submetidas à leitura espectrofotométrica a 560 nm e a porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle. Os experimentos foram realizados em triplicata (MOSMANN, 1983).

O ensaio da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio extracelular avalia a integridade das células sendo, portanto, mais um indício de viabilidade celular (PETEGNIEF et al., 2003).

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente os dados foram avaliados quanto a presença de *outliers* pelo teste de Grubbs e o teste Kolmogorov–Smirnov foi usado para se detectar distribuição gaussiana normal. Diferenças entre grupos foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias (com medidas repetidas, quando indicado), seguidas pelo teste de comparações múltiplas (*pos hoc*) de Fisher LSD. Os dados do western blot que não apresentaram distribuição normal, foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Os dados foram representados como média \pm E.P.M e diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o *software* Statistica (StatSoft, Inc., 2008), versão 8.0 e os gráficos foram construídos utilizando-se o *software* GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

Os resultados estão divididos em 3 capítulos para apresentação mais clara dos dados desta tese. O capítulo I refere-se aos resultados obtidos através do protocolo experimental I (artigo publicado na *Neurochemical Research*, 2013 38(3):660-668. *doi*: 10.1007/s11064-012-0965-0). O capítulo II refere-se aos resultados obtidos pelo protocolo experimental II; e por fim, o capítulo III refere-se aos resultados obtidos do estudo *in vitro* utilizando-se a linhagem celular SH-SY5Y.

5.1. CAPÍTULO I: PROBUCOL GERA NEUROPROTEÇÃO NUM MODELO EM CAMUNDONGOS DA DOENÇA DE PARKINSON UTILIZANDO-SE A 6-OHDA.

Este modelo provocou uma mortalidade de 50%, a qual foi observada a 1h após a administração de 6-OHDA. Os animais que sobreviveram à primeira hora não perderam peso e não apresentaram sinais detectáveis de toxicidade sistêmica durante o período experimental. A taxa de mortalidade dentro da primeira hora após a administração de 6-OHDA foi diminuída em 25% quando o probucol foi administrado simultaneamente. Além disso, um animal controle (grupo 3) morreu após injeção i.c.v. O número de animais no final dos tratamentos foi de vinte e três, como se segue: (1) Controle (n = 7), (2) 6-OHDA (n = 4), (3) Probucol (n = 6) e (4) Probucol + 6-OHDA (n = 6). Após as análises realizadas, os seguintes resultados foram obtidos:

5.1.1. O probucol previne a hiperlocomção induzida pela 6-OHDA

A atividade locomotora foi avaliada em caixas de atividades por 30 minutos, aos sete dias após a administração da toxina i.c.v. (figura 3). A 6-OHDA foi capaz de induzir uma hiperlocomção (barra 2, figura 3) nos camundongos ao compararmos com o grupo controle (barra 1, figura 3) ($P < 0,05$). Além disso, observou-se uma interação significativa da 6-OHDA e probucol, indicando que a administração de probucol foi capaz de prevenir a hiperlocomção induzida por 6-OHDA ($F_{(1,19)} = 7,57$; $P < 0,05$).

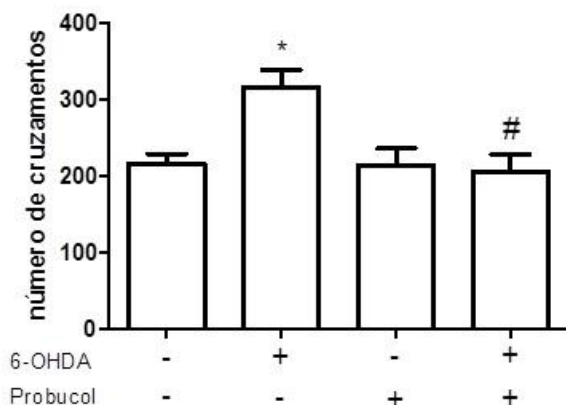


Figura 3: Efeito do tratamento com probucol na locomoção espontânea (avaliada por 30 minutos) dos camundongos aos sete dias após lesão por administração intracerebroventricular (i.c.v.) de 6-OHDA (60 μ g). A locomoção é expressa pelo número total de cruzamentos efetuados. Os dados são expressos em média \pm erro padrão. * $P<0,05$ significativamente diferente quando comparado com o grupo controle (primeira barra no gráfico) pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste *post-hoc* de Fisher LSD, # $P<0,05$ comparado com o grupo que recebeu apenas 6-OHDA i.c.v.; $n = 4-8$.

5.1.2. O probucol previne o estresse oxidativo induzido pela 6-OHDA no estriado

Os efeitos tóxicos da 6-OHDA são provenientes, pelo menos em parte, do estresse oxidativo intracelular que ocorre com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) após a entrada da toxina através dos transportadores da dopamina (DAT) (GLINKA; GASSEN; YODIM, 1997; KUMAR; AGARWAL; SETH, 1995; SANER; THOENEN, 1970). Portanto, foi avaliado um parâmetro de estresse oxidativo no estriado dos camundongos, que mede a peroxidação lipídica pelos níveis de substâncias reativas ao ácido tio barbitúrico (TBARS) (JANERO, 1990). A administração i.c.v. da 6-OHDA aumentou significativamente ($P<0,05$) a peroxidação lipídica no estriado dos animais e esse efeito não foi observado no grupo de animais

que recebeu tratamento com probucol + 6-OHDA, sugerindo que este composto foi capaz de prevenir as células contra a peroxidação lipídica (figura 4A). Por conseguinte, foi observado um efeito de interação significativa entre 6-OHDA \times probucol ($F_{(1,19)} = 20,05$; $P < 0,01$).

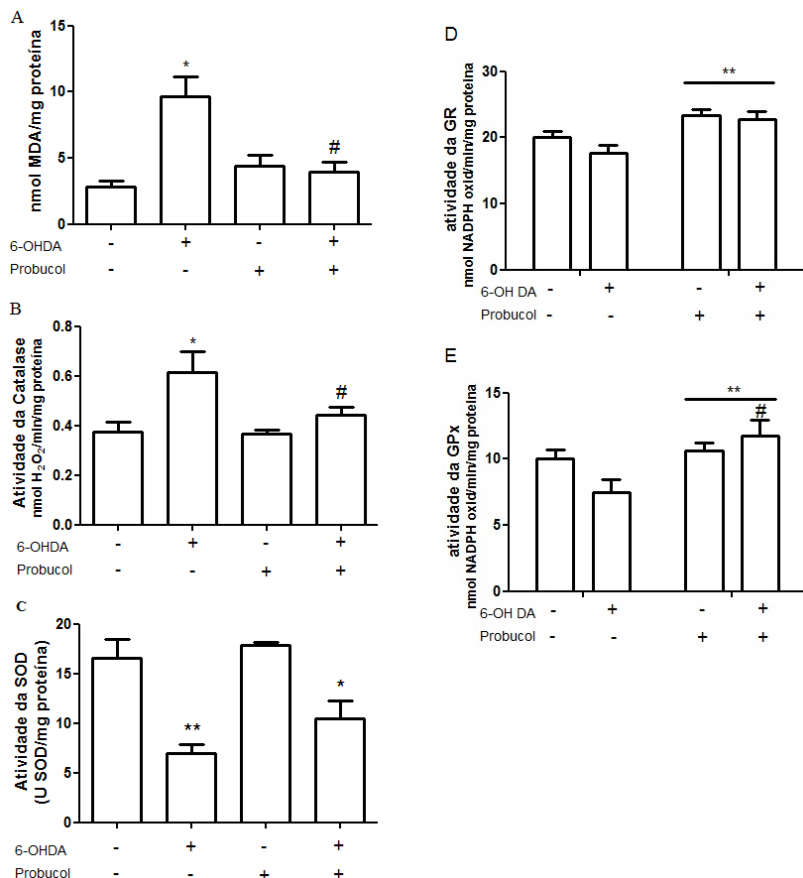


Figura 4: Enzimas antioxidantes – efeito do tratamento de probucol (11,8 mg / kg / dia, na água de beber) sobre (A) a peroxidação lipídica, (B) atividade da enzima catalase, (C) atividade da enzima superóxido dismutase, (D) glutatona redurase, e (E) glutatona peroxidase no estriado de camundongos *swiss* administrados intracerebro-ventricularmente (i.c.v.) com 6-OHDA (60 µg). Para avaliação da peroxidação lipídica, foi determinada a quantidade de substâncias

reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e os níveis são expressos como nmol de malondialdeído (MDA)/mg de proteína. A atividade da catalase é expressa como nmol de H_2O_2 consumido/min/mg de proteína. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média e obtidos pela análise de variância de duas vias (ANOVA), seguida por teste *post-hoc* de Fisher (LSD). * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (primeira barra); ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (gráfico C) e comparando grupos que receberam probucol com grupos que não receberam probucol (gráficos D e E), # $P < 0,05$ quando comparado com grupo lesionado (6-OHDA + DMSO) (segunda barra); $n = 4-8$.

Para investigar o efeito da 6-OHDA sobre os sistemas antioxidantes, avaliou-se a atividade da catalase, GR e GPx no estriado dos camundongos. Primeiramente, verificou-se que a toxina induziu um aumento significativo ($F_{(1,19)} = 13,45$; $P < 0,01$) da atividade da catalase no estriado, que foi atenuada por tratamento com probucol (figura 4B). Além disso, observou-se um efeito da administração da neurotoxina na atividade da SOD ($F_{(1,16)} = 20,80$; $P < 0,001$). Isto significa que a 6-OHDA induziu uma redução significativa da atividade da SOD estriatal, mas este efeito não foi atenuado por tratamento de probucol (figura 4C).

Na figura 4D e E, o efeito sobre a atividade das enzimas GPx e GR. A análise ANOVA de duas vias indicou efeito significativo do probucol na atividade da enzima GR ($F_{(1,19)} = 14,63$; $P < 0,01$); as análises do *post-hoc* indicaram que o tratamento com probucol aumentou significativamente a atividade da GR no estriado tanto nos animais tratados com veículo i.c.v. ($P = 0,023$) quando nos animais expostos à toxina 6-OHDA ($P = 0,008$). A análise ANOVA de duas vias também indicou efeito significativo do probucol ($F_{(1,19)} = 14,79$; $P < 0,01$) na atividade da GPx (figura 4E). Análises *post-hoc* indicaram que a atividade da GPx estriatal foi significativamente maior no grupo de camundongos expostos a 6-OHDA + probucol em comparação com o grupo controle ($P = 0,019$) ou com os animais expostos apenas a neurotoxina ($P = 0,0018$).

5.1.3. O Probucol diminui sinais de toxicidade nigro-estriatal induzidos pela 6-OHDA

A enzima tirosina hidroxilase (TH) é a enzima limitante na síntese dopaminérgica, e é um marcador conhecido na identificação de neurônios dopaminérgicos (KUMER; VRANA, 1996). Por isso, utilizou-se *Western blotting* para quantificação óptica da imunorreatividade da TH estriatal, observando-se que a 6-OHDA induziu uma redução significativa, que foi atenuado pelo tratamento de probucol ($P<0,05$) (figura 5A). Além disso, a administração de 6-OHDA diminuiu significativamente a imunorreatividade de sinaptofisina do estriado. Esta proteína é considerada um marcador pré-sináptico específico, pois é uma proteína de vesícula sináptica (WIEDENMANN; FRANKE, 1985). Notavelmente, esta redução não foi observada nos animais tratados com o probucol e 6-OHDA (Fig. 5B).

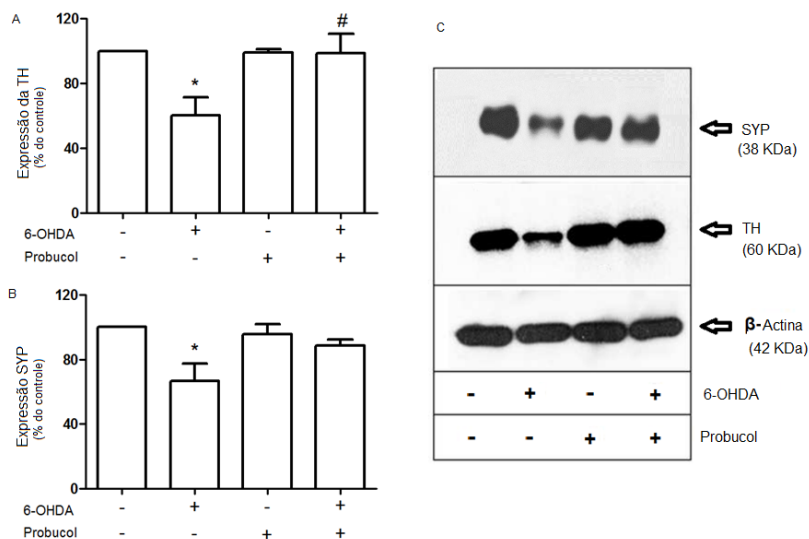


Figura 5: *Western Blotting* - Efeitos do tratamento com probucol (11,8 mg / kg / dia na água de beber) sobre a imunorreatividade da enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado de camundongos *Swiss* administrados via intracerebroventricular (i.c.v.) com 6-OHDA (60 μ g/sítio). (A) A expressão de TH foi determinada pela densidade óptica

em relação à β -actina. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ – comparação feita com o grupo controle; # $P < 0,05$ – comparação feita com o grupo 6-OHDA; os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. (B) membrana de *western blot* digitalizada.

5.2. CAPÍTULO II: EFEITOS DO SUCCINOBUCOL EM CAMUNDONGOS LESIONADOS COM 6-OHDA:

A administração de 6-OHDA i.c.v. na dose de 60 $\mu\text{g/sítio}$ utilizada no protocolo experimental I causou a perda de 6 animais. Com isto, no protocolo experimental II, do qual resulta os dados a seguir, optou-se pela administração de 40 $\mu\text{g/sítio}$ da neurotoxina, que também possui relatos prévios de utilização (OGAWA et al., 1994).

5.2.1. 6-OHDA afeta a coordenação motora, mas não afeta a atividade locomotora ou força dos camundongos

Com finalidade de avaliar os efeitos motores da administração de 6-OHDA, os animais foram submetidos ao teste do *rotarod*, onde observou-se que a infusão da neurotoxina induziu uma diminuição na latência para a primeira queda (tempo em segundos), e um aumento no número de quedas ($p < 0,001$, Figura 6A e B). Além disso, pode-se observar que o tratamento com succinobucol não foi capaz de alterar o comprometimento motor causado pela 6-OHDA na tarefa da barra rotatória.

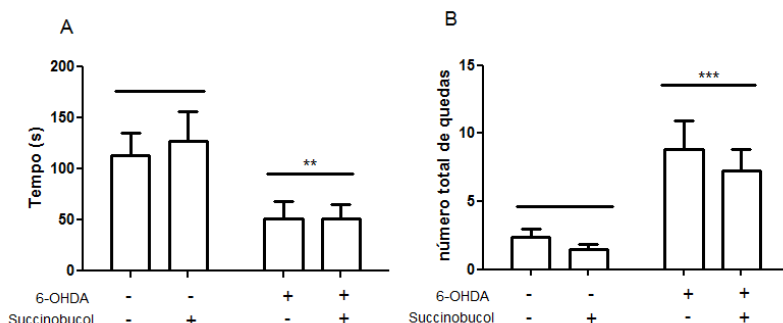


Figura 6: Efeito do tratamento com 40 μ g de 6-OHDA no teste da barra rotatória (*rotarod*). A infusão i.c.v. desta neurotoxina foi capaz de diminuir o tempo de latência da primeira queda (**A**) (efeito do tratamento – com $p=0,0038$, $F_{(1,37)}=9,55$), assim como aumentar o número total de quedas (**B**) – com $p=0,0002$, $F_{(1,36)}=16,82$). ** $P<0,005$ e *** $P<0,001$ significativamente diferentes quando comparado com os grupos que não receberam 6-OHDA pela análise de variância (ANOVA) de duas vias.

O tratamento com 40 μ g de 6-OHDA, assim como o tratamento com succinobucol, não foi capaz de induzir alterações significativas entre os grupos no número de cruzamentos e de exploração vertical (levantadas) no teste do campo aberto (figura 7A e B).

Avaliando-se o teste da inversão da grade, observou-se pelo gráfico da figura 7C que a administração da 6-OHDA, assim como o tratamento com succinobucol, não afetou este parâmetro.

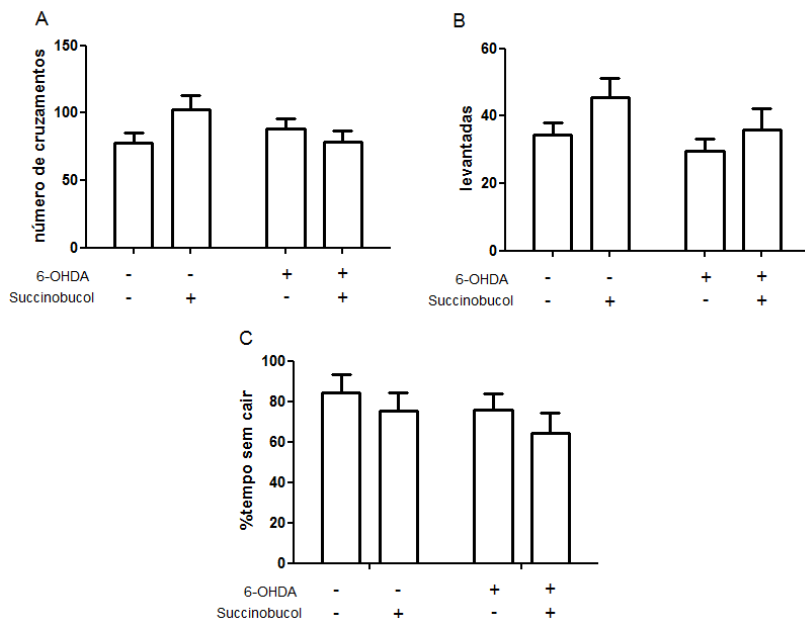


Figura 7: Teste do campo aberto (**A** e **B**) e teste da inversão da grade (**C**). O tratamento não gerou diferenças significativas no número de cruzamentos (**A**), nem na exploração vertical (**B**), nem na porcentagem de tempo sem cair (**C**) dos animais. Estatística feita por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste *post-hoc* de Fisher LSD.

5.2.2. Succinobucol protege parcialmente os efeitos da 6-OHDA na coordenação motora

O grupo de animais lesionado com 40µg i.c.v. de 6-OHDA mostraram uma significativa redução no percentual de sucessos ($***P<0,001$) comparado com o grupo controle. De maneira interessante, o succinobucol apresentou uma proteção parcial mostrada pelo aumento desse percentual quando comparado ao grupo de animais que recebeu somente a 6-OHDA ($*P<0,05$; $***P<0,001$; comparando-se com grupo controle; $\#P<0,05$ comparando-se com grupo lesionado com 6-OHDA) (figura 8).

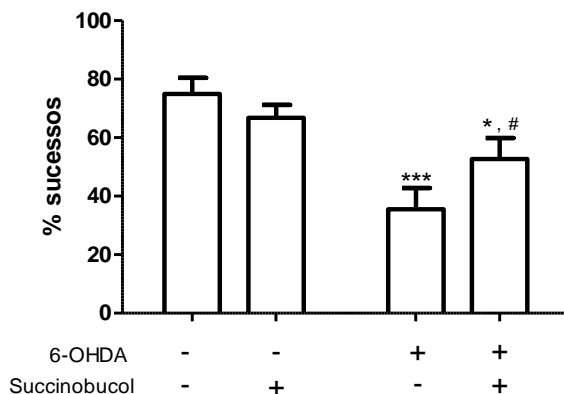


Figura 8: Efeito do tratamento com succinobucol na porcentagem de sucessos (avaliado no teste do alcance da pastilha de ração) dos camundongos aos sete dias após lesão por administração intracerebroventricular (i.c.v.) de 6-OHDA (40 $\mu\text{g/sítio}$). A porcentagem (%) de sucessos é expressa pelo número de sucesso/total de sucessos e fracassos efetuados. Os dados são expressos em média \pm erro padrão. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ significativamente diferente quando comparado com o grupo controle (primeira barra no gráfico) pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste *post-hoc* de Fisher LSD, # $P < 0,05$ comparado com o grupo que recebeu apenas 6-OHDA i.c.v.

5.2.3. A dose de 40 $\mu\text{g/sítio}$ i.c.v. de 6-OHDA não causa sinais de estresse oxidativo ou toxicidade no estriado

Os efeitos deletérios de 6-OHDA são mediados, pelo menos em parte, pelo estresse oxidativo provocado pela geração de ERO que ocorre devido a entrada desta neurotoxina nas células que contém o transportador de dopamina (DAT). Assim, examinamos as condições oxidativas do estriado através da mensuração dos níveis de TBARS (que infere sobre o índice de peroxidação lipídica) e também sobre as condições das enzimas antioxidantes. A administração de 40 $\mu\text{g/sítio}$ 6-OHDA não aumentou a peroxidação lipídica no estriado dos camundongos em comparação com o grupo controle (figura 9A). Além disso, as atividades de enzimas antioxidantes GPx e GR não foram alteradas por este tratamento nesse protocolo experimental (figura 9B e

C). Uma vez que, um dos mecanismos de indução de neurotoxicidade da 6-OHDA está relacionado com a inibição do complexo I mitocondrial (GLINKA; YODIM, 1995), a atividade das NADH desidrogenases foi avaliada em homogenato de estriado de camundongos. Sete dias após a infusão de 40 μ g/sítio de 6-OHDA, não foi possível se observar alteração na atividade dessas enzimas (complexo 1 da cadeia respiratória, inclusive) entre os diferentes grupos.

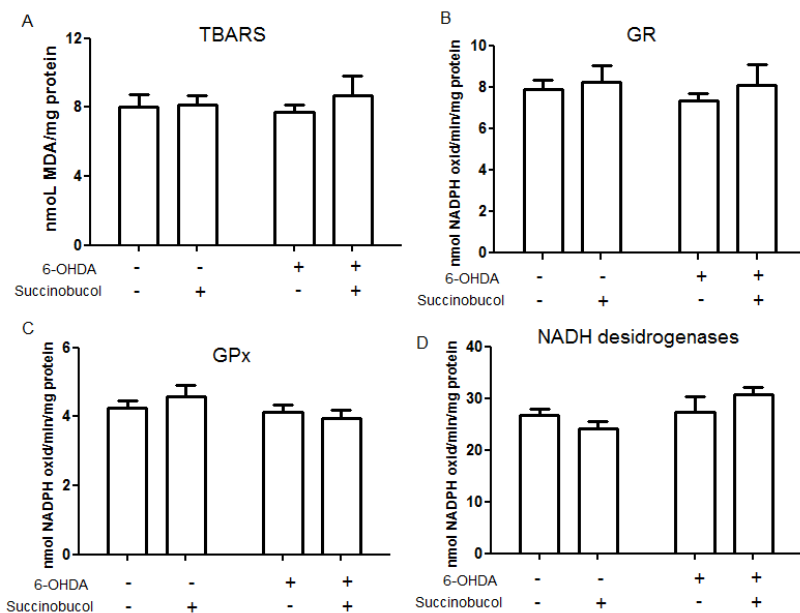


Figura 9: Níveis de TBARS (gráfico A), atividade da GR (gráfico B) e da GPx (gráfico C) medidos para avaliar situação oxidativa estriatal após infusão de 40 μ g de 6-OHDA. Não houve diferença significativa em relação ao grupo controle por análise de variância de duas vias (ANOVA). Atividade do complexo 1 mitocondrial e outras NADH desidrogenases (gráfico D) também não foi modificada significativamente em relação ao controle.

A administração de 40 μ g de 6-OHDA, assim como o tratamento com succinobucol, não afetaram significativamente a

marcação para tirosina hidroxilase (TH) no *western blot* realizado em estriado de camundongos (figura 10).

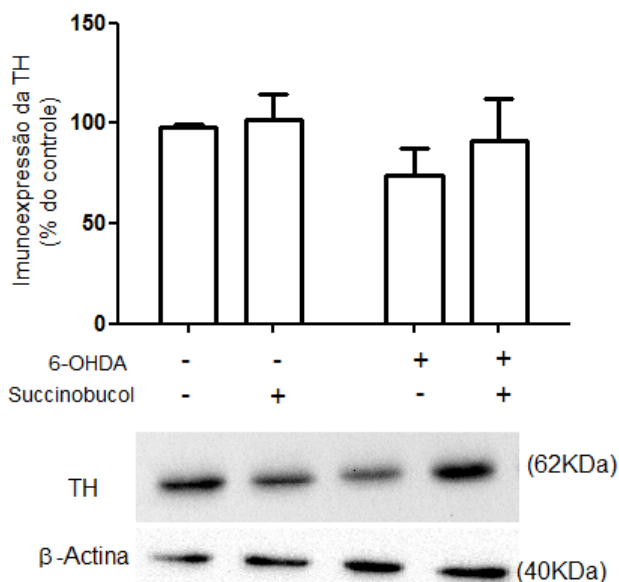


Figura 10: Efeitos do tratamento com succinobucol (10 mg/kg/dia i.p.) sobre a imunorreatividade da enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado de camundongos *Swiss* administrados via intracerebro-ventricular (i.c.v.) com 6-OHDA (40 µg/sítio). (A) A expressão de TH foi determinada pela densidade óptica em relação à β-actina. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. Sem diferença significativa em relação ao controle, feito por análise de variância de duas vias. (B) membrana de *western blot* digitalizada.

5.2.4. Efeitos sistêmicos do succinobucol nos camundongos

O colesterol total e os níveis de glicose plasmáticos diminuíram significativamente nos animais tratados com succinobucol, confirmando seus efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicêmico (STOCKER, 2009), independentemente da administração de 6-OHDA (** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, Tabela 4). Além disso, nem succinobucol nem um tratamento de 6-OHDA, induziram alterações significativas na variação do peso corporal dos camundongos (Tabela 4).

Tabela 4: Variação do peso corporal no protocolo experimental II, e níveis plasmáticos de colesterol e glicose.

Grupos	Variação do peso corporal (em g)	Colesterol	Glicose
Control	$-0,91 \pm 0,89$	$104,54 \pm 4,11$	$147,93 \pm 3,12$
Succinobucol	$-1,36 \pm 0,69$	$78,48 \pm 5,08^{**}$	$94,59 \pm 12,86^{**}$
6-OHDA 40 μ g	$-1,33 \pm 0,58$	$95,76 \pm 8,81$	$139,05 \pm 11,07$
6-OHDA 40 μ g + Suc	$-2,5 \pm 0,57$	$68,65 \pm 4,02^{***}$	$88,69 \pm 14,16^{**}$

5.3. CAPÍTULO III: EFEITO PROTETOR DO PROBUCOL EM CÉLULAS SH-SY5Y EXPOSTAS A NEUROTOXINA 6-OHDA

Este item apresenta resultados de estudos *in vitro* realizados em células de neuroblastoma humano (denominadas SH-SY5Y), que são perspectivas futuras para o presente trabalho. Como mencionado, objetivo principal deste trabalho foi investigar o possível efeito protetor do composto probucol frente à neurotoxicidade induzida por 6-OHDA em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).

5.3.1. Efeito da 6-OHDA na viabilidade celular

A figura 11 (gráficos A e B) mostra que a concentração de 60 μ M de 6-OHDA foi capaz de diminuir a viabilidade celular quando avaliada por ambos os testes. Portanto, esta concentração de 60 μ M foi selecionada para ensaio temporal de avaliação do momento (em horas – 1 a 24 h) em que se começa a detectar significância na diminuição da dessa viabilidade (12 horas, conforme curva de tempo; gráficos C e D).

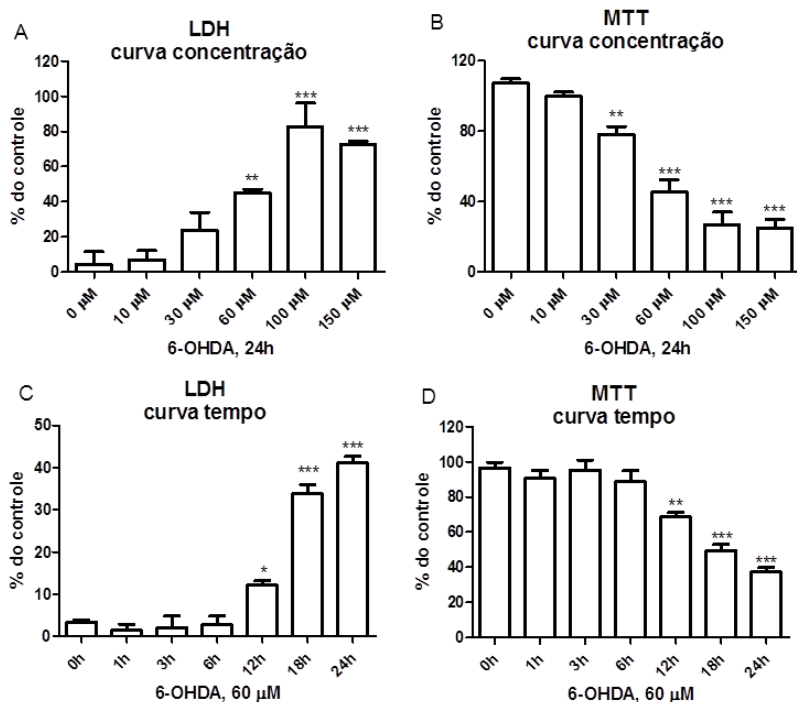


Figura 11: Efeito da 6-OHDA na viabilidade de células SH-SY5Y. Os gráficos A e B mostram a curva de concentração e os gráficos C e D representam a curva de tempo. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média ($n = 4 - 8$) e foram comparados com células não tratadas (nos gráficos A e B, a concentração de 0 μM representa células tratadas com veículo da 6-OHDA, que é solução 0,05% de ácido ascórbico). *, ** e *** representam diferença significativa ($P < 0,05$; $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente) quando comparados ao grupo controle por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey.

5.3.2 O probucol não interfere na sobrevivência celular

No intuito de investigar a possível ocorrência de efeito citotóxico do probucol adicionado diretamente sobre as células SH-SY5Y, as mesmas foram incubadas com diferentes concentrações deste composto (diluído em 0,5% DMSO) e, após 24 horas, realizou-se o teste

de viabilidade celular (optou-se apenas pelo teste do MTT, já que este teste se correlacionou com o teste da liberação da LDH). A figura 12 mostra que, nas concentrações testadas (1, 3, 10 e 30 μM), o probucol não diminuiu a viabilidade celular nas células SH-SY5Y.

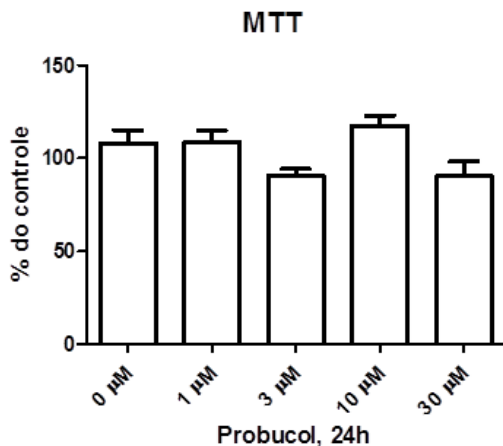


Figura 12: Efeito do probucol sobre a viabilidade de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Os dados são apresentados como percentagem do controle (células não tratadas) e a primeira barra do gráfico (0 μM) representa células tratadas com veículo do probucol (DMSO 0,5%). Dados expressos como média \pm erro padrão da média, com $n = 3-8$.

A concentração de probucol escolhida foi 10 μM , pois a concentração de 30 μM torna o meio turvo devido a baixa solubilidade do probucol em meio aquoso.

5.3.3 O pré-tratamento por 48h com probucol reverte em parte os efeitos tóxicos da 6-OHDA

Com o objetivo de investigar a resistência das células SH-SY5Y tratadas com probucol e 6-OHDA, a essas células foram pré-tratadas com probucol 10 μM 48h ou 24h antes da exposição a uma concentração de 60 μM de 6-OHDA. Também foi avaliada a resistência das células co-tratadas com probucol e 6-OHDA (no mesmo dia),

avaliando-se a viabilidade celular 24h após adição de 6-OHDA nos três casos. Os resultados deste experimento são apresentados nos gráficos da figura 13, onde o probucol mostrou reversão parcial da redução da viabilidade frente ao dano da 6-OHDA somente quando as células foram pré-tratadas com o composto por 48h.

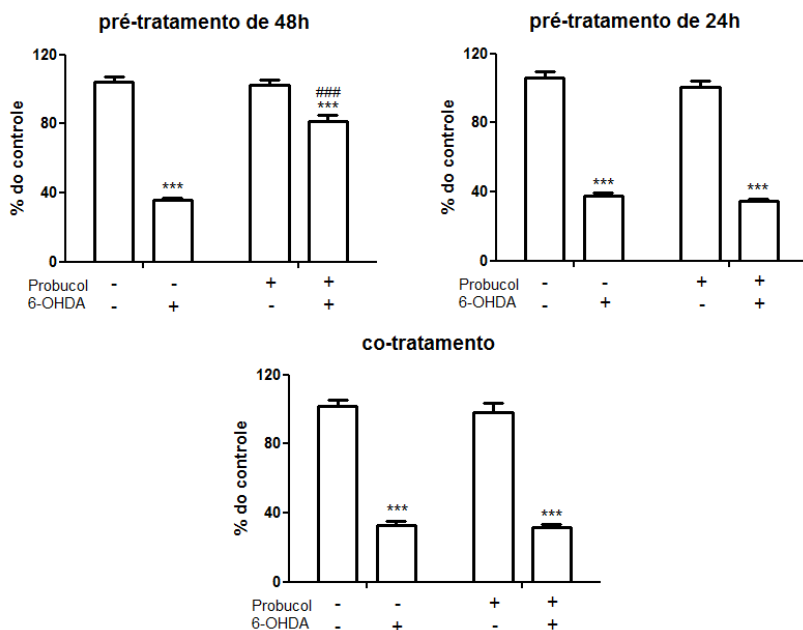


Figura 13: Efeito temporal da adição de probucol às células expostas à 6-OHDA (60 μ M, 24 h). As células SH-SY5Y foram expostas ao probucol (10 μ M) ou veículo (DMSO 0,5%) durante 1, 2 ou 3 dias (respectivamente, co-tratamento, pré-tratamento de 24 h e pré-tratamento de 48 h). Vinte e quatro horas antes do ensaio de viabilidade (MTT), as células foram expostas à 6-OHDA (60 μ M) ou veículo (ácido ascórbico 0,05%). Os dados são apresentados como percentagem da viabilidade observada nas células não tratadas, e expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 3$). *** $P < 0,001$ e indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle (primeira barra dos gráficos); # $P < 0,05$ e indica diferença significativa quando comparado ao grupo tratado apenas com 6-OHDA através de análise de variância de 2 vias seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD.

6. DISCUSSÃO

Muitas evidências apontam para o estresse oxidativo como um evento precoce e causal da DP (JENNER, 2003; ZHOU; HUANG; PRZEDBORSKI, 2008). De fato, a análise de tecido cerebral *post-mortem* de pacientes com DP e de tecidos do cérebro a partir de modelos animais mostraram que pode haver um aumento na peroxidação lipídica (DEXTER et al., 1989), nas lesões oxidativas ao DNA (ALAM et al., 1997) e na carbonilação de proteínas (ALAM et al., 1997; FLOOR; WETZEL, 1998). Estas evidências tem levado à hipótese de que a utilização terapêutica de antioxidantes pode ser benéfica no envelhecimento e em doenças neurodegenerativas, como PD (DI MATTEO; ESPOSITO, 2003; ZHOU; HUANG; PRZEDBORSKI, 2008).

Neste estudo, foram examinados os efeitos do probucol e do succinobucol, fármacos hipolipemiantes com propriedades anti-inflamatórias e antioxidante, frente à vulnerabilidade de neurônios dopaminérgicos ao estresse oxidativo induzido por 6-OHDA. No protocolo experimental I, o probucol foi capaz de diminuir sinais de neurotoxicidade (como hiperlocomoção e diminuição dos níveis de TH e sinaptofisina no estriado). Por outro lado, no protocolo experimental II, o succinobucol protegeu parcialmente os efeitos na coordenação motora fina (teste do alcance da pastilha de ração) induzidos por uma dose de 40 µg/sítio de 6-OHDA nos camundongos. Ademais, no protocolo experimental (*in vitro*) III, o pré-tratamento com o probucol (48 h) foi capaz de proteger as células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) contra a toxicidade da 6-OHDA (60 µM).

A 6-OHDA é uma neurotoxina catecolaminérgica seletiva que tem sido amplamente utilizada como modelos experimentais *in vivo* da DP (BEAL, 2001; BOVÉ; PERIER, 2012). O mecanismo tóxico deste composto é dependente da sua auto-oxidação com consequente produção de ERO e quinonas tóxicas que são capazes de induzir estresse oxidativo (COHEN, 1984; SOTO-OTERO et al., 2000). A perda seletiva de neurônios dopaminérgicos centrais induzidas pela administração de 6-OHDA produz perdas sinápticas no estriado, alterando, assim, a regulação e a função do sistema dopaminérgico (KOSTRZEWA; READER; DESCARRIES, 1998; READER; DEWAR, 1999). Vários mecanismos de compensação, como por exemplo, o aumento da densidade dos receptores pós-sinápticos de dopamina D2, são ativados em resposta à lesão para compensar a diminuição de DA quando ocorre

a morte de neurônios secretores desse neurotransmissor (UNGERSTEDT, 1971). Neste estudo (protocolo experimental I) vimos que após 7 dias da infusão i.c.v. de 60 µg de 6-OHDA, os camundongos apresentaram hiperlocomção na caixa de atividade. A degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra induzida pela toxina 6-OHDA causa uma neuroplasticidade no estriado, alterando a regulação e função do sistema dopaminérgico, induzindo assim, alterações comportamentais, especialmente em relação à locomoção (KOSTRZEWA; READER; DESCARRIES, 1998; READER; DEWAR, 1999). Este resultado pressupõe que mecanismos compensatórios podem inicialmente mascarar deficiências motoras subjacentes, resultado da alteração da inervação no estriado, pois além disso, a hiperlocomção induzida pela administração de 6-OHDA foi correlacionada com uma diminuição significativa dos níveis da enzima TH nesta região, o que sugere que as terminações nervosas dopaminérgicas estão reduzidas, provavelmente pela morte de neurônios secretores de DA. Interessantemente, esses resultados mostram que a administração de probucol foi capaz de impedir tanto hiperlocomção quanto a diminuição dos níveis de TH no estriado dos camundongos, sugerindo uma potencial ligação entre os dois eventos.

Com o protocolo experimental II, administrou-se uma dose menor da neurotoxina e, com isso, não observamos o mesmo efeito de hiperlocomção, nem redução significativa na imunorreatividade para TH no estriado. O teste da inversão da grade avalia a força neuromuscular e a capacidade do animal segurar numa grade invertida (TILLERSON; MILLER, 2003). Esse parâmetro também não foi afetado no protocolo experimental II, isto é, 7 dias após a administração da 6-OHDA (40 µg/sítio), no qual os animais não apresentaram comprometimento na capacidade para sustentar o peso de seu corpo numa grade invertida. No entanto, o teste da barra rotatória (*rotarod*) requer que o animal se equilibre e ande em um cilindro rotativo sendo amplamente utilizado para testar e medir habilidades de coordenação motora (BROOKS; DUNNETT, 2009), assim como o teste do alcance da pastilha de ração (*single-pellet*) que requer que o animal execute uma sequência complexa de movimentos com a finalidade de alcançar uma pastilha de ração através de uma estreita fenda na câmara (ORDOÑEZ-LIBRADO et al., 2008). Neste estudo, os testes de coordenação motora mostraram redução significativa na capacidade de se equilibrar (*rotarod*) ou ter sucesso em alcançar a ração (*single-pellet*) no grupo de animais que receberam 6-OHDA, quando comparado com o controle. O tratamento com o succinobucol (10 mg/kg, i.p., 15 dias) apresentou

melhora significativa na performance no teste do alcance da pastilha de ração, em comparação com o grupo de animais tratados com 6-OHDA. De fato, a coordenação motora, especialmente das mãos (para escrita, chamada de micrografia, pois a escrita se torna muito pequena), é um dos sintomas motores frequentes em pacientes com a DP (CONTRERAS-VIDAL; TEULINGS; STELMACH, 1995; MCLENNAN et al., 1972; XIA; MAO, 2012), e o teste do alcance da pastilha de ração para os roedores avalia claramente o comprometimento motor na pata dianteira (PLOWMAN et al., 2013). Em estudo com modelo hemi-parkinsoniano em ratos (no qual se depleta a via nigrostriatal de apenas um hemisfério cerebral, observando-se prejuízos motores contralaterais) a análise dos animais indicou que o déficit no teste foi atribuído a uma falha para se levantar a pata (supinação) e liberar a comida à boca, o que foi minimizado após reabilitação (VERGARA-ARAGON; GONZALEZ; WHISHAW, 2003). Neste contexto, o grupo de camundongos que recebeu 40 µg/sítio da neurotoxina (protocolo experimental II), apesar de não ter apresentado redução na imunorreatividade para TH e, por isso, não podermos indicar que houve comprometimento na via nigrostriatal, apresentaram um déficit comportamental avaliado por testes de coordenação motora. De maneira interessante, o pré-tratamento com o succinobucol foi capaz de proteger parcialmente essas alterações motoras observadas.

Como discutido anteriormente, o dano nigroestriatal causado pela 6-OHDA é dependente da sua oxidação com concomitante produção de quinonas reativas, H_2O_2 , O_2^- e OH (GLINKA; GASSEN; YODIM, 1997; KUMAR; AGARWAL; SETH, 1995; SANER; THOENEN, 1970). No presente estudo, através do protocolo experimental I, foi mostrado que a infusão i.c.v. de 60 µg/sítio de 6-OHDA aumentou os níveis de peroxidação lipídica, bem como a atividade de catalase no estriado dos camundongos, em comparação ao grupo controle. De fato, as células cerebrais são vulneráveis ao estresse oxidativo e o excesso de EROs gerado pode alterar o mecanismo de defesa antioxidante e aumentar os níveis de peroxidação lipídica (DRINGEN; PAWLOWSKI; HIRRLINGER, 2005; DRINGEN, 2005; GHOSH; GHOSH; MANDAL, 2011). Embora a catalase tenha uma atividade baixa nos neurônios, nestes resultados apontam para uma possível importante ação desta enzima na remoção de H_2O_2 , tendo em vista o aumento de sua atividade nos animais expostos à 6-OHDA. A literatura demonstra que, quando há uma elevada concentração de H_2O_2 , a catalase é fundamental para detoxificar esse substrato, uma vez que a constante de equilíbrio (KM) da catalase para o H_2O_2 é maior do que a

GPx (BAUD et al., 2004; MOZAFFAR et al., 1986). De grande importância para este trabalho, um estudo anterior do nosso grupo mostrou que a atividade da catalase também estava aumentada no cérebro de animais expostos ao metilmercúrio como resposta compensatória a propriedades pró-oxidantes deste toxicante (FARINA et al., 2003). Assim, sugere-se que a catalase parece ser altamente responsiva a um aumento da concentração de EROs.

Por outro lado, a 6-OHDA causou uma diminuição significativa da atividade da SOD estriatal. Esta enzima tem um papel importante na catálise da dismutação do ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) para H_2O_2 , que geralmente é neutralizado em seguida pela catalase (MCCORD; FRIDOVICH, 1988). Neste trabalho, a atividade da catalase foi aumentada em resposta ao tratamento com 6-OHDA. Consequentemente, a evidência experimental indica que os acontecimentos que geram estresse oxidativo e aumentam os níveis de H_2O_2 podem levar a um aumento da atividade da catalase (FARINA et al., 2003; OH; LIM, 2006), provavelmente como uma resposta compensatória para neutralizar o dano oxidativo mediado por H_2O_2 . Embora a atividade da SOD estriatal esteja diminuída no nosso protocolo, é provável que esta redução não seja suficiente para evitar o aumento dos níveis de H_2O_2 , que pode ser resultante de uma função mitocondrial interrompida ou por causa da oxidação da dopamina (TERLAND et al., 1997). Além disso, o probucol impediu o aumento da atividade da catalase induzida pela 6-OHDA, assim como exibiu um de aumento da atividade da GPx e GR estriatais. Embora tenhamos observado um efeito modulatório positivo do probucol na atividade da GPx, de acordo também com relatos anteriores (FARINA et al., 2009), a capacidade direta que tem o probucol em eliminar EROs (efeito *scavenger*) (BRIDGES; SCOTT; BELCH, 1991) não pode ser desconsiderado como um possível mecanismo pelo qual se impediu a peroxidação lipídica estriatal induzida pela 6-OHDA e, conseqüentemente, outros marcadores de neurotoxicidade (como a hiperlocomução e a diminuição da TH e os níveis de sinaptofisina).

Contudo, no protocolo II, não observamos sinais de estresse oxidativo (os níveis de MDA e a atividade das enzimas GR e GPx dos animais tratados com a 6-OHDA foram equivalentes ao grupo controle) nem de inibição do complexo I mitocondrial, como poderia-se esperar com a utilização desta substância (GLINKA; YODIM, 1995). Com relação aos parâmetros de estresse oxidativo, pode ser que esta dose mais baixa usada da neurotoxina (40 $\mu\text{g/sítio}$) tenha sido detoxificada pelos sistemas antioxidantes celulares no tempo decorrido da

administração até a morte dos animais (8 dias). De fato, estudos anteriores com modelo de administração intraventricular mostram que, aos 7 dias da administração da 6-OHDA, a quantificação do MDA (nível de TBARS) está igual ao controle (OGAWA et al., 1994; TANAKA; OGAWA; ASANUMA, 2006); porém, nestes estudos citados, observa-se que os marcadores de estresse oxidativo estavam previamente presentes, como nos dias 1 e 3, assim como posteriormente, nos dias 14 e 28 após a administração da neurotoxina. Isto é, não se pode afirmar que o modelo não causou estresse oxidativo apenas avaliando-se aos 7 dias após a administração da neurotoxina, pois eventos pró-oxidativos prévios podem ter ocorrido (DRINGEN; PAWLOWSKI; HIRRLINGER, 2005; DRINGEN, 2000, 2005). Com relação à ausência de efeitos significativos na administração de 6-OHDA (protocolo II) na atividade do complexo 1 da cadeia respiratória mitocondrial, não se pode descartar que a discordância com resultados prévios (GLINKA; TIPTON; YODIM, 1996) esteja relacionada às diferenças de metodologias de análise. De fato, em nosso estudo, avaliou-se a atividade enzimática em um homogenato estriatal obtido 8 dias após a administração i.c.v. da neurotoxina. Além de trabalharem com tempos diferentes (avaliando a atividade enzimática logo após a adição da 6-OHDA), estudos prévios (GLINKA; TIPTON; YODIM, 1996) realizaram as análises em mitocôndrias isoladas.

Considerando os resultados do protocolo experimental II em relação a redução do colesterol e da glicose plasmática, estes estão de acordo com o reportado na literatura sobre os efeitos conhecidos do succinobucol (STOCKER, 2009). Ainda, sugerem que a dose de succinobucol utilizada em nosso estudo é uma dose que causa o efeito terapêutico do composto estudado (hipocolesterolemizante).

Em relação ao mecanismo de ação, sabemos que o probucol e succinobucol são fármacos hipolipêmicos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Neste trabalho, utilizamos essas substâncias em modelos *in vivo* e *in vitro* de neurotoxicidade com a 6-OHDA e evidenciamos o papel neuroprotetor dos compostos. Este efeito está provavelmente relacionado às suas propriedades antioxidantes (neutralização de EROs), não podendo descartar a ação anti-inflamatória desses compostos.

O probucol, além de reduzir os níveis plasmáticos de colesterol, possui atividade antioxidante, anti-inflamatória e antiaterosclerótica, e tem uma longa história de utilização clínica para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares (YAMASHITA; MATSUZAWA, 2009; YAMASHITA et al., 2008). No entanto, sua

aplicação clínica hoje é limitada porque mostrou provocar arritmias ventriculares (MCDOWELL et al., 1994) e redução nos níveis de HDL no plasma (TARDIF; GRÉGOIRE; L'ALLIER, 2002). Alternativamente, succinobucol (o derivado do probucol) retém propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias equipotentes aos do composto padrão, mas não causa efeitos colaterais cardiovasculares mencionadas (KUNSCH et al., 2004; STOCKER, 2009), indicando uma potencial vantagem em comparação ao probucol. Portanto, do ponto de vista farmacológico e clínico, é importante um estudo como este, no qual se utiliza e compara esses dois fármacos. Pode-se, portanto, considerar estas substâncias como uma promissora estratégia para minimizar eventos oxidativos no processo neurodegenerativo.

Em relação aos estudos *in vitro*, observou-se que uma pré-incubação de 48h foi necessária para que o probucol apresentasse efeito protetor contra a toxicidade da 6-OHDA em células SH-SY5Y. De fato, não houve efeitos protetores quando o probucol foi adicionado nos tempos 0 e 24 h. Estes resultados sugerem que seu efeito protetor *in vitro* pode não estar relacionado a uma atividade *scavenger* direta, mas provavelmente a eventos dependentes de síntese proteica. A utilização de um inibidor de síntese proteica (como a cicloheximida) poderia contribuir para elucidar estes mecanismos de proteção.

A partir dos resultados derivados dos protocolos experimentais I, II e III, acredita-se ter contribuído significativamente para o avanço da área em estudo. Levando-se em consideração o cenário real dos estudos bioquímicos e farmacológicos com o probucol e succinobucol, em que têm-se demonstrado propriedades promissoras como antiaterogênico e anti-diabéticos (TARDIF et al., 2008; YAMASHITA; MATSUZAWA, 2009) (CRIM et al., 2010), acredita-se que os resultados da presente tese são de significativa relevância científica.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que:

CAPÍTULO I:

- O tratamento com probucol foi capaz de diminuir significativamente a hiperlocomção induzida pela administração i.c.v. de 6-OHDA em camundongos;
- O probucol preveniu contra o estresse oxidativo induzido pela 6-OHDA avaliado pela redução na peroxidação lipídica no estriado, e pela manutenção da atividade da catalase aos níveis do controle;
- O fármaco ainda preveniu contra sinais de toxicidade estriatal pela manutenção da expressão da TH no estriado;
- O composto probucol aumentou a atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e glutathione redutase no estriado dos animais, podendo este evento ser responsável pela neuroproteção observada nesse modelo *in vivo*;

De um modo geral, o probucol apresentou resultados neuroprotetores importantes no modelo da DP. Uma perspectiva futura para prosseguimento neste trabalho seria avaliar os efeitos do probucol em outro modelo experimental da doença.

CAPÍTULO II:

- O tratamento com o succinobucol preveniu parcialmente o déficit na coordenação motora induzida pela 6-OHDA nos camundongos;
- Os níveis plasmáticos de colesterol e glicose foram reduzidos com a administração de 10 mg/kg de succinobucol por 15 dias i.p.;
- A dose de 40 µg/sítio i.c.v. de 6-OHDA não causou alterações significativas nos marcadores de estresse oxidativo, assim como não apresentou redução da imunorreatividade para TH estriatal;
- 8 dias após a administração de 6-OHDA, não foi possível confirmar a inibição da enzima do complexo 1 mitocondrial.

De modo geral, os resultados do capítulo II indicam que o succinobucol teve efeito modulador, por prevenir, mesmo que parcialmente, os efeitos na coordenação motora. Portanto, o modelo

utilizado não respondeu algumas questões importantes e, por isso, o succinobucol deve ser investigado em um outro modelo da DP.

CAPÍTULO III:

- O tratamento da cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y com 60 μM de 6-OHDA causou redução na viabilidade celular após incubação por 12h;
- O probucol, nas concentrações de 1, 3, 10 e 30 μM não causou interferência na viabilidade celular;
- A pré-incubação por 48h com probucol (a 10 μM) previne parcialmente a redução da viabilidade celular induzida pela adição de 60 μM de 6-OHDA, embora não houve proteção quando o tempo da pré-incubação com probucol foi de 24 h ou quando o composto foi adicionado juntamente com a toxina;

De modo geral, os resultados do capítulo III indicam que a redução da viabilidade celular induzida pela 6-OHDA em cultura de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) é parcialmente revertida pela pré-incubação por 48h de probucol. Os dados sugerem que seu efeito protetor *in vitro* pode não estar relacionado a uma atividade *scavenger* direta, mas provavelmente a eventos dependentes de síntese proteica. Uma perspectiva neste contexto seria a investigação do provável mecanismo de ação do efeito protetor do probucol, utilizando um inibidor de síntese proteica (como a cicloheximida). Ainda, a medida do aparecimento de espécies reativas de oxigênio poderia contribuir na elucidação de mecanismos de ação da 6-OHDA e do probucol nas células SH-SY5Y.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. et al. Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson ' s disease. **Indian J Med Res**, v. 121, p. 111–115, 2005.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–6, jan. 1984.

ALAM, Z. I. et al. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. **Journal of neurochemistry**, v. 69, n. 3, p. 1196–203, set. 1997.

ALAM, Z. I. et al. A Generalised Increase in Protein Carbonyls in the Brain in Parkinson's but Not Incidental Lewy Body Disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 3, p. 1326–1329, 18 nov. 1997.

AL-MAJED, A. A. Probucol attenuates oxidative stress, energy starvation, and nitric acid production following transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2011, p. 471590, jan. 2011.

BARNHART, J. W.; SEFRANKA, J. A.; DAVID D MCINTOSH. Hypocholesterolemic Effect of 4,4'-(Isopropylidenedithio)-Bis(2,6-di-t-Butylphenol) (Probucol). **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 23, n. 9, p. 1229–1233, 1970.

BAUD, O. et al. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 7, p. 1531–40, 18 fev. 2004.

BEAL, M. F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 325–34, maio 2001.

BLUM, D. et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 65, n. 2, p. 135–172, out. 2001.

BOVÉ, J. et al. Toxin-Induced Models of Parkinson ' s Disease. **neuroRx**, v. 2, n. July, p. 484–494, 2005.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51–76, 1 jun. 2012.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51–76, 1 jun. 2012.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. **Journal of neurology**, v. 247 Suppl , p. II3–10, abr. 2000.

BRIDGES, A. B.; SCOTT, N. A.; BELCH, J. J. Probucol, a superoxide free radical scavenger in vitro. **Atherosclerosis**, v. 89, n. 2-3, p. 263–5, ago. 1991.

BROOKS, S. P.; DUNNETT, S. B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 519–29, jul. 2009.

CAREW, T. E.; SCHWENKE, D. C.; STEINBERG, D. Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 21, p. 7725–9, nov. 1987.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in enzymology**, v. 113, p. 484–90, jan. 1985.

CASSINA, A; RADİ, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 328, n. 2, p. 309–16, 15 abr. 1996.

CHINTA, S. J.; ANDERSEN, J. K. Reversible inhibition of mitochondrial complex I activity following chronic dopaminergic glutathione depletion in vitro: implications for Parkinson's disease. **Free radical biology & medicine**, v. 41, n. 9, p. 1442–8, 1 dez. 2006.

CHINTA, S. J.; ANDERSEN, J. K. Redox imbalance in Parkinson's disease. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1780, n. 11, p. 1362–7, nov. 2008.

COHEN, G. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. **Neurotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 77–82, jan. 1984.

COLLE, D. et al. Probucol modulates oxidative stress and excitotoxicity in Huntington's disease models in vitro. **Brain research bulletin**, v. 87, n. 4-5, p. 397–405, 10 mar. 2012.

COLLE, D. et al. Succinobucol versus probucol: higher efficiency of succinobucol in mitigating 3-NP-induced brain mitochondrial dysfunction and oxidative stress in vitro. **Mitochondrion**, v. 13, n. 2, p. 125–33, mar. 2013.

CONTRERAS-VIDAL, J. L.; TEULINGS, H. L.; STELMACH, G. E. Micrographia in Parkinson's disease. **Neuroreport**, v. 6, n. 15, p. 2089–92, 23 out. 1995.

CRIM, W. S. et al. AGI-1067 , a novel antioxidant and anti-inflammatory agent , enhances insulin release and protects mouse islets. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 323, n. 2, p. 246–255, 2010.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889–909, 11 set. 2003.

DAVIDSON, M. H. et al. Assessment of lipoprotein profiles study (ALPS) and antioxidant activity in healthy subjects treated with AGI-1067. **Journal of clinical lipidology**, v. 1, n. 4, p. 271–9, ago. 2007.

DEXTER, D. T. et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 52, n. 2, p. 381–9, fev. 1989.

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free radical biology & medicine**, p. 1–13, 4 fev. 2013.

DI MATTEO, V.; ESPOSITO, E. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. **Current drug targets. CNS and neurological disorders**, v. 2, n. 2, p. 95–107, abr. 2003.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in neurobiology**, v. 62, n. 6, p. 649–71, dez. 2000.

DRINGEN, R. Oxidative and antioxidative potential of brain microglial cells. **Antioxidants & redox signaling**, v. 7, n. 9-10, p. 1223–33, 2005.

DRINGEN, R.; HIRRLINGER, J. Glutathione pathways in the brain. **Biological chemistry**, v. 384, n. 4, p. 505–16, abr. 2003.

DRINGEN, R.; PAWLOWSKI, P. G.; HIRRLINGER, J. Peroxide detoxification by brain cells. **Journal of neuroscience research**, v. 79, n. 1-2, p. 157–65, 2005.

FACTOR, S. A. Current Status of Symptomatic Medical Therapy in Parkinson's Disease. **Neurotherapeutics**, v. 5, n. April, p. 164–180, 2008.

FARINA, M. et al. Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. **Toxicology letters**, v. 144, n. 3, p. 351–7, 15 out. 2003.

FARINA, M. et al. Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 112, n. 2, p. 416–26, dez. 2009.

FARR, T. D.; WHISHAW, I. Q. Quantitative and Qualitative Impairments in Skilled Reaching in the Mouse (*Mus musculus*) After a Focal Motor Cortex Stroke. **Stroke**, v. 33, n. 7, p. 1869–1875, 1 jul. 2002.

FLOOR, E.; WETZEL, M. G. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. **Journal of neurochemistry**, v. 70, n. 1, p. 268–75, jan. 1998.

FUKAE, J.; MIZUNO, Y.; HATTORI, N. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Mitochondrion**, v. 7, n. 1-2, p. 58–62, 2007.

GHOSH, N.; GHOSH, R.; MANDAL, S. C. Antioxidant protection: A promising therapeutic intervention in neurodegenerative disease. **Free radical research**, v. 45, n. 8, p. 888–905, 7 ago. 2011.

GLINKA, Y.; GASSEN, M.; YODIM, M. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. **Journal of neural transmission**, v. 50, p. 55–66, 1997.

GLINKA, Y.; TIPTON, K. F.; YODIM, M. B. Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. **Journal of neurochemistry**, v. 66, n. 5, p. 2004–10, maio 1996.

GLINKA, Y. Y.; YODIM, M. B. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. **European journal of pharmacology**, v. 292, n. 3-4, p. 329–32, 16 mar. 1995.

GOETZ, C. G. Jean-Martin Charcot and the aging brain. **Archives of neurology**, v. 59, n. 11, p. 1821–4, nov. 2002.

GRAHAM, D. et al. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. **molecular pharmacology**, v. 14, p. 644–653, 1978.

HALEY, T. J.; MCCORMICK, W. G. Pharmacological effects produced by intra-cerebral injection of drugs in the conscious mouse. **British journal of pharmacology**, v. 12, p. 12–15, 1957.

HENCHCLIFFE, C.; BEAL, M. F. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. **Nature clinical practice. Neurology**, v. 4, n. 11, p. 600–9, nov. 2008.

HIRSCH, E.; GRAYBIEL, A. M.; AGID, Y. A. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. **Nature**, v. 334, p. 345–348, 1988.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free radical biology & medicine**, v. 9, n. 6, p. 515–40, jan. 1990.

JENNER, P. Oxidative Stress in Parkinson ' s Disease. **Annals of neurology**, v. 53, n. 3, p. 26–38, 2003.

JEON, H. et al. Pharmacokinetics and tolerability of probucol after multiple oral administrations in healthy volunteers. **International journal of clinical pharmacology and therapeutics**, v. 49, n. 11, p. 688–95, nov. 2011.

KOSTRZEWA, R. M.; READER, T. A; DESCARRIES, L. Serotonin neural adaptations to ontogenetic loss of dopamine neurons in rat brain. **Journal of neurochemistry**, v. 70, n. 3, p. 889–98, mar. 1998.

KUMAR, R.; AGARWAL, A.; SETH, P. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. **Journal of neurochemistry**, v. 64, n. 4, p. 1703–1707, 1995.

KUMER, S. C.; VRANA, K. E. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. **Journal of neurochemistry**, v. 67, n. 2, p. 443–62, ago. 1996.

KUNSCH, C. et al. Selective Inhibition of Endothelial and Monocyte Redox- Sensitive Genes by AGI-1067 : A Novel Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent. **the journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 308, n. 3, p. 820–829, 2004.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's Disease - First of Two Parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 15, p. 1044 – 1053, 1998.

LANGSTON, J. W. The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. **Neurology**, v. 47, n. 6 Suppl 3, p. S153–60, dez. 1996.

LATINI, A et al. 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. **Neuroscience**, v. 135, n. 1, p. 111–20, jan. 2005.

LAURSEN, S. E.; BELKNAP, J. K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **Journal of pharmacological methods**, v. 16, n. 4, p. 355–7, dez. 1986.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2055–66, 13 jun. 2009.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 932–42, dez. 2002.

MALAGUTTI, K. S. et al. 17B-Estradiol Decreases Methylmercury-Induced Neurotoxicity in Male Mice. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 293–7, mar. 2009.

MANDEL, S.; YODIM, M. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free radical biology & medicine**, v. 37, n. 3, p. 304–317, 2004.

MANDEL, S.; YODIM, M. B. H. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free radical biology & medicine**, v. 37, n. 3, p. 304–17, 1 ago. 2004.

MARTIN, H. L.; TEISMANN, P. Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 10, p. 3263–72, out. 2009.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; NÚÑEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595–603, nov. 1999.

MAYEUX, R. Epidemiology of neurodegeneration. **Annual review of neuroscience**, v. 26, p. 81–104, jan. 2003.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). **Free radical biology & medicine**, v. 5, n. 5-6, p. 363–9, jan. 1988.

MCDOWELL, I. F. et al. The effect of probucol and vitamin E treatment on the oxidation of low-density lipoprotein and forearm vascular responses in humans. **European journal of clinical investigation**, v. 24, n. 11, p. 759–65, nov. 1994.

MCLENNAN, J. E. et al. Micrographia in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 15, n. 2, p. 141–152, fev. 1972.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. CHEMISTRY AND METABOLISM OF SUBSTANCES OF LOW MOLECULAR WEIGHT : The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. **The Journal of biological chemistry**, v. 247, p. 3170–3175, 1972.

MOHANASUNDARI, M. et al. Enhanced neuroprotective effect by combination of bromocriptine and Hypericum perforatum extract against MPTP-induced neurotoxicity in mice. **Journal of the neurological sciences**, v. 249, n. 2, p. 140–4, 15 nov. 2006.

MOREIRA, E. L. G. et al. Central nervous system activity of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* in rats. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 62, n. 8, p. 1061–8, ago. 2010.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

MOZAFFAR, S. et al. Properties of catalase purified from a methanol-grown yeast, *Kloeckera* sp. 2201. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 155, n. 3, p. 527–31, 17 mar. 1986.

OBESO, J. et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **nature medicine**, v. 16, n. 6, p. 653–661, 2010.

OGAWA, N. et al. Changes in lipid peroxidation, Cu/Zn-superoxide dismutase and its mRNA following an intracerebroventricular injection of

6-hydroxydopamine in mice. **Brain research**, v. 646, n. 2, p. 337–40, 23 maio 1994.

OH, S.-H.; LIM, S.-C. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation.

Toxicology and Applied Pharmacology, v. 212, n. 3, p. 212–223, 2006.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–8, jun. 1979.

ORDOÑEZ-LIBRADO, J. L. et al. Inhalation of divalent and trivalent manganese mixture induces a Parkinson's disease model: immunocytochemical and behavioral evidences. **Neuroscience**, v. 155, n. 1, p. 7–16, 31 jul. 2008.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. 1817. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 14, n. 2, p. 223–36; discussion 222, jan. 2002.

PARKINSON STUDY GROUP. Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, p. 176–183, 1993.

PETEGNIEF, V. et al. Transforming growth factor- α attenuates N-methyl-D-aspartic acid toxicity in cortical cultures by preventing protein synthesis inhibition through an Erk1/2-dependent mechanism. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 32, p. 29552–9, 8 ago. 2003.

PLOWMAN, E. K. et al. Differential sensitivity of cranial and limb motor function to nigrostriatal dopamine depletion. **Behavioural brain research**, v. 237, p. 157–63, 15 jan. 2013.

POIRIER, J. Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 26, n. 3, p. 355–61, mar. 2005.

READER, T. A.; DEWAR, K. M. Effects of denervation and hyperinnervation on dopamine and serotonin systems in the rat neostriatum:

implications for human Parkinson's disease. **Neurochemistry international**, v. 34, p. 1–21, 1999.

RIDET, J.-L. et al. Lentivirus-mediated expression of glutathione peroxidase: neuroprotection in murine models of Parkinson's disease. **Neurobiology of disease**, v. 21, n. 1, p. 29–34, jan. 2006.

SANER, A.; THOENEN, H. Model Experiments on the Molecular Mechanism of Action of 6-Hydroxydopamine. **molecular pharmacology**, v. 7, p. 147–154, 1970.

SANTOS, D. B. et al. Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. **Experimental neurology**, v. 233, n. 2, p. 767–75, fev. 2012.

SCHAPIRA, A. H. V. Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. **Trends in pharmacological sciences**, v. 30, n. 1, p. 41–7, jan. 2009.

SHULTS, C. W. et al. Effects of Coenzyme Q 10 in Early Parkinson Disease: evidence of slowing of the functional decline. **Archives of neurology**, v. 59, p. 1541–1550, 2002.

SOTO-OTERO, R. et al. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 74, n. 4, p. 1605–12, abr. 2000.

SPICA, V. et al. Prevalence of non-motor symptoms in young-onset versus late-onset Parkinson's disease. **Journal of neurology**, 22 jul. 2012.

STOCKER, R. Molecular mechanisms underlying the antiatherosclerotic and antidiabetic effects of probucol, succinobucol, and other probucol analogues. **Current opinion in lipidology**, v. 20, n. 3, p. 227–35, jun. 2009.

STRINGARI, J. et al. Postnatal methylmercury exposure induces hyperlocomotor activity and cerebellar oxidative stress in mice: dependence on the neurodevelopmental period. **Neurochemical research**, v. 31, n. 4, p. 563–9, abr. 2006.

TABNER, B. J. et al. Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A-beta and alfa-synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. **Free radical biology & medicine**, v. 32, n. 11, p. 1076–1083, 2002.

TANAKA, K.; OGAWA, N.; ASANUMA, M. Molecular basis of 6-hydroxydopamine-induced caspase activations due to increases in oxidative stress in the mouse striatum. **Neuroscience letters**, v. 410, n. 2, p. 85–9, 20 dez. 2006.

TARDIF, J. et al. Effects of succinobucol (AGI-1067) after an acute coronary syndrome : a randomised , double-blind , placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 371, p. 1761–1768, 2008.

TARDIF, J.-C.; GRÉGOIRE, J.; L'ALLIER, P. L. Prevention of restenosis with antioxidants: mechanisms and implications. **American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions**, v. 2, n. 5, p. 323–34, jan. 2002.

TAWARA, K.; TOMIKAWA, M.; ABIKO, Y. Mode of Action of Probucol Cholesterol in Reducing in Mice. **Japanese journal of pharmacology**, v. 40, p. 123–133, 1986.

TERLAND, O. et al. Dopamine Oxidation Generates an Oxidative Stress Mediated by Dopamine Semiquinone and Unrelated to Reactive Oxygen Species. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 29, n. 6, p. 1731–1738, 1997.

THIRUCHELVAM, M. et al. Overexpression of superoxide dismutase or glutathione peroxidase protects against the paraquat + maneb-induced Parkinson disease phenotype. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 23, p. 22530–9, 10 jun. 2005.

TILLERSON, J. L.; MILLER, G. W. Grid performance test to measure behavioral impairment in the MPTP-treated-mouse model of parkinsonism. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 123, n. 2, p. 189–200, mar. 2003.

UNGERSTEDT, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. **Acta physiologica Scandinavica. Supplementum**, v. 367, p. 69–93, jan. 1971.

VERGARA-ARAGON, P.; GONZALEZ, C. L. R.; WHISHAW, I. Q. A Novel Skilled-Reaching Impairment in Paw Supination on the “Good” Side of the Hemi-Parkinson Rat Improved with Rehabilitation. **J. Neurosci.**, v. 23, n. 2, p. 579–586, 15 jan. 2003.

VON BOHLEN UND HALBACH, O.; SCHOBER, A; KRIEGLSTEIN, K. Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson’s disease. **Progress in neurobiology**, v. 73, n. 3, p. 151–77, jun. 2004.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, v. 77, p. 325–33, jan. 1981.

WIEDENMANN, B.; FRANKE, W. W. Identification and Localization of Synaptophysin, an Integral Membrane Glycoprotein of Mr 38,000 Characteristic of Presynaptic Vesicles. **cell**, v. 41, p. 1017–1028, 1985.

XIA, R.; MAO, Z.-H. Progression of motor symptoms in Parkinson’s disease. **Neuroscience bulletin**, v. 28, n. 1, p. 39–48, fev. 2012.

YAMAMOTO, A. A Unique Antilipidemic Drug – Probucol. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 15, n. 6, p. 304–305, 2008.

YAMASHITA, S. et al. Long-term probucol treatment prevents secondary cardiovascular events: a cohort study of patients with heterozygous familial hypercholesterolemia in Japan. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 15, n. 6, p. 292–303, dez. 2008.

YAMASHITA, S.; MATSUZAWA, Y. Where are we with probucol: a new life for an old drug? **Atherosclerosis**, v. 207, n. 1, p. 16–23, nov. 2009.

ZHOU, C.; HUANG, Y.; PRZEDBORSKI, S. Oxidative stress in Parkinson’s disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1147, p. 93–104, dez. 2008.